

**FRANCISCO VAZ DE CARVALHO ESTEVES**

**IDENTIFICAÇÃO DE MÚLTIPLOS MARCADORES  
POLIMÓRFICOS EM *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*:  
RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA**

**LISBOA**

2010





**FRANCISCO VAZ DE CARVALHO ESTEVES**

(Bolsheiro de Doutoramento pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia,  
Aluno de Doutoramento pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa)

**IDENTIFICAÇÃO DE MÚLTIPLOS MARCADORES  
POLIMÓRFICOS EM *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII*:  
RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA**



**LISBOA**

**2010**



*« A evolução é apenas tentativa e erro – mas em que os êxitos são estimulados e multiplicados e os falhanços são implacavelmente exterminados, com fabulosas perspectivas de tempo disponível para que o processo se efectue».*

Carl Sagan e Ann Druyan (1996), “Sombras de antepassados esquecidos”.



Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia, pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.





A presente dissertação foi realizada sob a orientação da Professora Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos, na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, e sob a co-orientação do Professor Doutor Jorge Francisco Gaspar, do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Nova de Lisboa. O doutorando usufruiu de uma Bolsa de Doutoramento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia e Fundo Social Europeu no âmbito do Quadro Comunitário de Apoio (referência SFRH/BD/22193/2005).



Aos meus heróis,  
meus pais.  
À minha outra metade,  
minha mulher.



## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Olga Matos, que orientou o presente trabalho, deixo o testemunho da minha gratidão pela confiança que em mim depositou, pelo constante estímulo, e pelas oportunidades que me proporcionou. Os meus sinceros agradecimentos pela amizade, pelo empenho e entusiasmo na orientação deste trabalho, pelo incentivo, pela forma encorajadora com que me ajudou a ultrapassar dificuldades e pelos valiosos ensinamentos, num tema, para o qual muito tem contribuído.

Ao Professor Doutor Jorge Gaspar, co-orientador do presente trabalho, queria expressar o meu profundo agradecimento pelo apoio, incentivos, preciosos ensinamentos e, acima de tudo, pela amizade que sempre demonstrou. O meu reconhecimento pela disponibilidade e entusiasmo na co-orientação deste trabalho e, muito em especial, pela maneira prática, frontal e persistente com que me ensinou a encarar as adversidades típicas de um trabalho científico.

Ao Professor Doutor Francisco Antunes, membro da comissão tutorial do presente trabalho, expresso os meus mais sinceros agradecimentos pela atenção dispensada, pelas oportunidades que me concedeu, e acima de tudo, pelo incentivo à minha formação e valorização, numa área científica, na qual é um especialista impar.

Ao Professor Dr. Kamal Mansinho, o meu muito obrigado pela preciosa disponibilidade na recolha de material biológico e dos dados clínicos dos doentes.

Ao Professor Doutor José Rueff, o meu profundo agradecimento pela simpatia, conselhos e permanente solicitude durante a execução do projecto.

Ao Professor Doutor Sebastião Rodrigues, agradeço a amizade, o auxílio e a permanente disponibilidade que demonstrou nas várias fases do trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Adélcia Tavares e à Eng.<sup>a</sup> Inês Moser, o meu agradecimento à amizade e ao apoio prestado, indispensáveis na execução do presente trabalho.

Ao Dr. Tiago Martins, ao Dr. Ricardo Leite e ao Dr. Diogo Bento, quero agradecer o empenho na recolha das amostras e da informação clínica dos doentes.

A todos os colegas que tive o prazer de conhecer no Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas, o meu muito obrigado pelo apreço, simpatia e amizade com que me acolheram, em particular, à Eng.<sup>a</sup> Susana Silva, ao Dr. Bruno Gomes e à Mestre Marta Pingarilho, o meu reconhecimento pela inestimável ajuda na execução de algumas técnicas fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Rogério Tenreiro e ao Microbiology and Biotechnology Laboratory do BioFIG (FCUL), em especial ao Eng.<sup>o</sup> Gonçalo Bernardo Costa, agradeço a disponibilidade e o precioso apoio.

A todos os caros colegas que passaram pela Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, a minha gratidão pelo companheirismo e simpatia, muito em especial, à Mestre Luísa Lobo, à Doutora Marina Costa e à Doutora Margarida Alves, pela forma amiga como me acolheram, desde o primeiro momento, e pela inestimável ajuda que me deram durante este período. Ao Dr. António Amorim e à Dr.<sup>a</sup> Vera Codices o meu reconhecimento pela ajuda, pela convivência e pela amizade.

Aos meus pais, pelo afecto e dedicação, por terem conseguido ensinar-me aquilo que é o mais importante, por sempre terem sido exemplo. Aos meus avós, pelo carinho e compreensão, por terem sido inestimáveis referências do meu quotidiano. Aos meus sogros pela amizade e apoio incessantes. A toda a minha família, tios, primos e amigos, um profundo obrigado por tudo aquilo que me proporcionaram e me deram, porque: Nós somos a nossa família e os nossos amigos.

À Paula, quero agradecer todo o carinho e compreensão que constroem e alicerçam a nossa relação. Muito obrigado pelo apoio incondicional e inestimável que me permitiram transpor mais uma etapa, de muitas que nos aguardam.

A todos, muito obrigado.

## Publicações

A partir do conjunto de resultados, obtidos no decurso do presente projecto de doutoramento, foram publicados os seguintes trabalhos, em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

**ESTEVES F, MONTES-CANO MA, DE LA HORRA C, COSTA MC, CALDERON EJ, ANTUNES F, MATOS O. (2008).** *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(4): 356-362.

**ESTEVES F, TAVARES A, COSTA MC, GASPAR J, ANTUNES F, MATOS O. (2009).** Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of *Pneumocystis jirovecii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(2): 175-178.

**ESTEVES F, GASPAR J, TAVARES A, MOSER I, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2010).** Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infection Genetics and Evolution*, 10(2): 192-199.

**ESTEVES F, GASPAR J, MARQUES T, LEITE R, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2010).** Identification of relevant Single-Nucleotide Polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7): 878-884.



A partir dos resultados desta dissertação, foram apresentados trabalhos em reuniões científicas, cujos resumos foram publicados em livros de resumos ou em revistas nacionais, ou internacionais, com comité de leitura:

**ESTEVES F, COSTA MC, DE LA HORRA C, MONTES-CANO MA, SILVA C, ANTUNES F, MATOS O. (2006).** *Pneumocystis jirovecii* ITS and DHPS genotyping profiles in patients from Portugal and Spain [resumo 14.032]. *International Journal of Infectious Diseases*, 10 Suppl 1: S98.

**ESTEVES F, GASPAR J, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2006).** Cytochrome *b* gene sequence of *Pneumocystis jirovecii* in Portuguese population – Preliminary study. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 13(1-2): 90-91.

**ESTEVES F, COSTA MC, GASPAR J, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2007).** Detection and genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* cytochrome *b* in HIV-positive Portuguese patients. [resumo P-1890]. 47<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois, USA. Livro de resumos: 473.

**ESTEVES F, COSTA MC, MOSER MI, GASPAR J, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2007).** MnSOD gene sequence of *Pneumocystis jirovecii* in HIV-positive Portuguese patients: Preliminary study. [resumo P-1891]. 47<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois, USA. Livro de resumos: 474.

**ESTEVES F, COSTA MC, MOSER MI, TAVARES A, GASPAR J, MARQUES T, LEITE R, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2008).** *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping: Relationship with clinical data – Preliminary study. [resumo PL43]. X International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP-10), Boston, Massachusetts, USA. Livro de resumos: 70-71.

**ESTEVEES F, GASPAR J, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2008).** Molecular analysis of three *Pneumocystis jirovecii* loci in HIV-Positive Portuguese patients. [resumo PO8]. X International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP-10), Boston, Massachusetts, USA. Livro de resumos: 37-38.

**ESTEVEES F, GASPAR J, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O.** Caracterização de três genes nucleares de *Pneumocystis jirovecii* em doentes seropositivos para VIH. (2008). [resumo OB07]. Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, SIDA e Parasitologia (IX Congresso Nacional de Doenças Infecciosas/Microbiologia Clínica, 7º Congresso Nacional sobre Sida, XII Congresso Português de Parasitologia), Vilamoura, Portugal. Livro de resumos: 23.

**ESTEVEES F, COSTA MC, MOSER MI, TAVARES A, GASPAR J, MARQUES T, LEITE R, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O.** Genotipagem multilocus de *Pneumocystis jirovecii*: Relação com a apresentação clínica – estudo preliminar. (2008). [resumo OB08]. Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, SIDA e Parasitologia (IX Congresso Nacional de Doenças Infecciosas/Microbiologia Clínica, 7º Congresso Nacional sobre Sida, XII Congresso Português de Parasitologia), Vilamoura, Portugal. Livro de resumos: 24.

**ESTEVEES F, GASPAR J, MARQUES T, LEITE R, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2009).** *Pneumocystis jirovecii* Multilocus Genotyping Based on Relevant Single Nucleotide Polymorphisms: Relationship with Clinical Data. [resumo P-369]. 49<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, São Francisco, California, EUA. Livro de resumos: P-369.

**ESTEVEES F, GASPAR J, TAVARES A, MOSER I, AMORIM A, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2009).** Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* isolated from human immunodeficiency virus-positive patients (HIV). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 16(1-2): 408-409.

**ESTEVES F, GASPAR J, MARQUES T, LEITE R, ANTUNES F, MANSINHO K, MATOS O. (2009).** Occurrence of multilocus polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: Relationship with clinical data. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 16(1-2): 410-411.

## Resumo

*Pneumocystis jirovecii* é um importante agente infeccioso, causador de pneumonia (PPc) em doentes com infecção vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/sida), tendo sido, também, já descritos casos de infecção em imunocompetentes ou em doentes com graus moderados de imunodeficiência. Sequências polimórficas de ácido desoxirribonucleico (DNA) são detectadas frequentemente em isolados de *P. jirovecii*, sugerindo que a variação genética é comum neste microrganismo e que diversos subtipos genéticos podem existir. Permanecem por esclarecer as razões pelas quais os doentes sofrem de diferentes graus de severidade de PPc. Alguns estudos apontam para que determinados indicadores do prognóstico clínico possam estar relacionados com a apresentação e a evolução da infecção por *P. jirovecii*. Por outro lado, também é sugerido que polimorfismos específicos possam determinar características epidemiológicas do microrganismo, como a distribuição geográfica de determinados subtipos, os modos de transmissão, ou mesmo, fenómenos de resistência a fármacos, ou diferentes graus de virulência. Coloca-se a hipótese de que a virulência de um determinado subtipo de *P. jirovecii* possa estar dependente de múltiplos genes e, portanto, da associação de polimorfismos múltiplos que ocorrem em diversas regiões do genoma.

Com o objectivo de identificar genes potencialmente associados com factores da infecção por *P. jirovecii* e com o propósito de desenvolver técnicas moleculares de alto rendimento, efectuou-se o estudo da variabilidade genética de isolados deste microrganismo, em Portugal. O trabalho envolveu a recolha de espécimes pulmonares de doentes infectados por *P. jirovecii* com diferentes características clínicas e integrou as metodologias de imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM), reacção de polimerização em cadeia (PCR), sequenciação directa, análise de fragmentos de restrição (RFLP), PCR *multiplex*, genotipagem por reacção de polimerização de base única (SBE), PCR em tempo real (RT-PCR) e DNA *pooling*.

Os genes candidatos considerados no presente estudo, foram seleccionados com base numa extensa pesquisa bibliográfica: o gene da subunidade grande do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*), o gene do citocromo *b* (*CYB*), o gene da superóxido dismutase (*SOD*), o gene da  $\beta$ -tubulina ( $\beta$  *TUB*), o gene da tiorredoxina reductase

(*TRR1*), o gene da timidilato sintetase (*TS*), o gene da dihidrofolato reductase (*DHFR*), o gene da dihidropteroato sintetase (*DHPS*), a região conservada (*UCS*) dos genes da família das glicoproteínas major de superfície (*MSG*) e o gene da protease *kexin-like* (*KEX1*). Este procedimento inicial, permitiu avaliar o interesse relativo destes 10 *loci*, verificar a informação sobre as respectivas sequências, sua variabilidade, importância a nível metabólico e a potencialidade para estas regiões poderem estar relacionadas com características da infecção, como resistência a fármacos, ou factores de virulência.

A diversidade genética, as frequências de distribuição de genótipos e a relação entre os genótipos observados e diversos parâmetros da infecção, foram investigadas por PCR seguido de sequenciação directa, ou RFLP. A análise dos resultados permitiu confirmar o declínio das mutações associadas a fenómenos de resistência aos fármacos da família das sulfas, em Portugal, provavelmente como consequência do decréscimo no uso de profilaxia anti-*P. jirovecii* com sulfas, após a introdução da terapêutica anti-retrovírica potente (HAART). Nos 10 *loci* de *P. jirovecii* analisados, foram identificados e caracterizados, um total de 23 polimorfismos, dos quais, quatro (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHFR312*) demonstraram estar relacionados com parâmetros clínicos da infecção, e, por isso, foram considerados como relevantes no seguimento da investigação. Verificou-se que um genótipo específico (*SOD110C/SOD215T*) demonstrou estar associado a casos de PPc com maior severidade, enquanto que outros dois genótipos (*mt85C/SOD215C* e *SOD110T/SOD215C*) foram associados a casos de PPc com menor severidade. A análise cruzada das sequências permitiu detectar correlações estatisticamente significativas entre diversos polimorfismos, sugerindo a existência de potenciais haplótipos. Observou-se um elevado grau de recombinação entre os genótipos multilocus (MLGs) de *P. jirovecii*, sendo que, um dos MLGs (MLG E) se encontrava sobre-representado na população, sugerindo uma estrutura epidémica, na qual o fenómeno de recombinação genética é frequente, mas onde ocasionalmente, um clone bem sucedido, tende, rapidamente, a aumentar a sua frequência originando um clone epidémico.

A técnica de PCR *multiplex*/SBE foi aplicada com sucesso na identificação de polimorfismos genéticos de *P. jirovecii* em *pools* de DNA, demonstrando que é possível uma análise num formato múltiplo, abrangendo um elevado número de amostras. A metodologia proposta demonstrou ser uma ferramenta útil na caracterização do perfil

genético de *P. jirovecii*, permitindo a amplificação e caracterização de diversos fragmentos, de uma forma rápida, implicando redução de custos e de tempo de operação, e possibilitando, a aplicação em larga escala. A associação das técnicas de PCR *multiplex*/SBE e de DNA *pooling* por RT-PCR permitiu determinar a distribuição das frequências relativas dos polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110* em subgrupos de doentes, com diferentes características clínicas. Esta abordagem, possibilitou a identificação de SNPs presentes nos diferentes subgrupos, permitindo a classificação de polimorfismos, aparentemente, não relevantes (ex. *DHFR312*), e, conseguindo seleccionar outros polimorfismos, potencialmente relacionados com diferentes parâmetros da infecção (ex. *mt85*, *SOD215* e *SOD110*). Assim, os SNPs seleccionados podem, de alguma forma, estar associados a haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas, ou seja, potencialmente implicados em diferentes graus de severidade da doença.

Os resultados obtidos com o presente estudo, permitem colocar a hipótese de que haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas podem existir, e que, regiões genéticas específicas podem funcionar como marcadores desses mesmos organismos. A aplicação das metodologias de alto rendimento, propostas nesta investigação, pode acelerar a identificação de polimorfismos de *P. jirovecii* relevantes a nível clínico, permitindo uma aproximação baseada em haplótipos para caracterização clínica deste microrganismo patogénico, auxiliando e adequando a escolha do tratamento mais indicado, possibilitando assim, um melhor controlo da doença. A robustez, sensibilidade e especificidade, demonstradas pelas técnicas de PCR *multiplex*/SBE e de DNA *pooling*, fazem com que sejam indicadas, não só para o estudo de *P. jirovecii*, mas também para o estudo de inúmeros microrganismos, em especial de microrganismos não cultiváveis, nos quais, a limitação da amostra, faz com que sejam requeridas técnicas de alta capacidade, para que seja possível a caracterização de isolados, tal como ficou demonstrado, no presente estudo, para o caso de *P. jirovecii*.



## Abstract

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PcP) is a common and serious disease in persons infected with the human immunodeficiency virus (HIV). *P. jirovecii* has also been isolated from immunocompetent persons and patients with moderate degrees of immunodeficiency. Polymorphic desoxiribonucleic acid (DNA) sequences are frequently detected in *P. jirovecii* isolates suggesting that genetic variation is common in this organism and different genetic subtypes may exist. Several aspects of the disease remain unknown; particularly the reasons why some patients suffer from moderate PcP with favorable response to the anti-*P. jirovecii* drugs, while others suffer from severe PcP, which could be fatal, despite therapy. While several prognostic indicators have been associated with the outcome of PcP, advances in understanding the genetic diversity of *P. jirovecii* have shown that specific polymorphisms could determine epidemiological profiles of the pathogen, including geographical distribution, modes of transmission, drug resistance, and virulence of particular subtypes. Data suggests that the virulence of a specific *P. jirovecii* genetic subtype may be dependent on multiple polymorphisms that occur at several genomic regions.

The aims of the present study were to: (i) investigate possible associations between relevant polymorphic sequences and *P. jirovecii* infection parameters; (ii) develop a novel molecular approach based on new high-throughput methodologies.

A description of genetic diversity in *P. jirovecii* isolates, collected from Portuguese infected patients presenting different clinical parameters, based on the identification of multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs), was achieved using indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies (IFI/AcM), polymerase chain reaction (PCR), DNA sequencing, restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), multiplex-PCR, single base extension (SBE), real time PCR (RT-PCR), and DNA pooling.

The candidate *P. jirovecii* DNA regions were selected based on literature research. A total of 10 distinct loci were considered the most promising sequences: the mitochondrial large-subunit rRNA (*mtLSU rRNA*), the cytochrome *b* (*CYB*), the superoxide dismutase (*SOD*), the  $\beta$ -tubulin ( $\beta$  *TUB*), the thioredoxin reductase (*TRRI*), the thymidylate synthase (*TS*), the dihydrofolate reductase (*DHFR*),



the dihydropteroate synthase (*DHPS*), the upstream conserved region (*UCS*) of the major surface glycoprotein gene (*MSG*), and the kexin-like serine protease (*KEX1*). The importance of the candidate *loci* were evaluated based on the bibliographic research. This initial step provided substantial information about sequence variation, metabolic pathways, and the relationship between these sequences and parameters of infection, such as drug resistance or virulence.

The genetic diversity, the frequency distribution of genotypes and the relationship between observed genotypes and different parameters of infection were investigated using PCR followed by DNA sequencing or RFLP. The results confirmed a decline of *P. jirovecii* mutations associated with resistance to sulfa drugs in Portugal, probably as a result of the decreased use of sulfa prophylaxis after the introduction of the highly active antiretroviral therapy (HAART). Twenty three SNPs were detected and characterized among the 10 loci studied, of which four (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHFR312*) were demonstrated to be related to clinical parameters of infection, and therefore were considered as relevant sequence variations to be analyzed in the subsequent investigation. It was found that a particular genotype (*SOD110C/SOD215T*) showed to be associated with more virulent PcP episodes, whereas two other genotypes (*mt85C/SOD215C* and *SOD110T/SOD215C*) were associated with less virulent PcP episodes. The study of associated variations and cross-genetic analysis demonstrated significant statistical associations between several SNPs, suggesting the existence of *P. jirovecii* haplotypes. The results also suggested large recombination between most *P. jirovecii* multilocus genotypes (MLGs). However, one specific MLG (MLG E) occurred at a higher frequency than would be expected according to panmitic expectations, suggesting linkage disequilibrium and clonal propagation. The persistence of this specific MLG may be a consequence of clonal reproduction of this successful genotypic array in a *P. jirovecii* population with epidemic structure.

Multiplex amplification of genomic DNA associated with single base extension genotyping showed to be a suitable high-throughput methodology for large-scale *P. jirovecii* SNPs screening. The association of multiplex-PCR/SBE and DNA pooling by RT-PCR showed to be a reliable methodology to estimate *P. jirovecii* SNPs allele frequencies in *P. jirovecii* DNA pools. The proposed methodology proved to be a useful tool to study the *P. jirovecii* genetic profile, providing the characterization of multiple

fragments in a cost-saving fast format, in which equal amounts of DNA from a large number of individual samples are pooled and then genotyped. In the present study, the relative frequencies of *DHFR312*, *mt85*, *SOD215*, and *SOD110* were calculated in several subgroups of patients with different clinical features. This strategy provided a final selection of effectively important polymorphisms, allowing the exclusion of *P. jirovecii* polymorphisms apparently without clinical relevance (e.g. *DHFR312*), and the classification of other polymorphisms, correlated with specific parameters of PcP (e.g. *mt85*, *SOD215* and *SOD110*). These SNPs may be associated with specific *P. jirovecii* haplotypes potentially involved with different degrees of virulence in PcP episodes. These results suggest that *P. jirovecii* haplotypes with distinct characteristics may exist and that specific genetic regions are expected to be suitable molecular markers for epidemiological and clinical applications.

The high-throughput methodologies proposed in the present research were designed to accelerate the identification of clinical relevant *P. jirovecii* polymorphisms. Further application of these techniques will supply a haplotype based approach for clinical characterization of this pathogenic microorganism, leading to tailored treatment choices, and better management of the disease. The robustness and sensitivity shown by multiplex-PCR/SBE and DNA pooling demonstrated that these techniques are indicated for the study of *P. jirovecii* SNPs with clinical relevance, and for the study of SNPs of other microorganisms, especially those without an *in vitro* culture system, in which high-sensitivity techniques are required due to sample limitation, as demonstrated in the present study for *P. jirovecii*.



## Lista de abreviaturas

<b>%</b>	– Percentagem
<b>% (m/v)</b>	– Percentagem massa/volume
<b>°C</b>	– Grau Celsius
<b>5S rRNA</b>	– Sequência pequena do RNA ribossômico da subunidade grande ribossomal
<b>5.8S rRNA</b>	– Sequência pequena do RNA ribossômico da subunidade grande ribossomal
<b>18S rRNA</b>	– Subunidade pequena do RNA ribossômico
<b>26S rRNA</b>	– Sequência grande do RNA ribossômico da subunidade grande ribossomal
<b>A, C, G, T</b>	– Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina e timina)
<b><math>\alpha</math> TUB</b>	– Alfa tubulina
<b>AcM</b>	– Anticorpo monoclonal
<b>ADP</b>	– Adenosina difosfato
<b>ARC</b>	– Estádio relacionado com a evolução da síndrome de imunodeficiência adquirida, do inglês <i>AIDS related complex</i>
<b>ASD</b>	– Estudo do espectro do vírus da imunodeficiência humana em adultos e adolescentes, do inglês <i>Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease</i>
<b>ASO</b>	– Sonda aleloespecífica de hibridação, do inglês <i>allele specific oligonucleotide</i>
<b>ATP</b>	– Adenosina trifosfato
<b><math>\beta</math> TUB</b>	– Beta tubulina
<b>BSA</b>	– Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
<b>CDC</b>	– Centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América, do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> .
<b>C<sub>T</sub></b>	– Ciclo limite de amplificação, do inglês <i>threshold cycle</i>
<b>CoA</b>	– Coenzima A
<b>CoQ</b>	– Coenzima Q
<b>CYB</b>	– Citocromo <i>b</i>

<b>DHFR</b>	– Dihidrofolato reductase
<b>DHPS</b>	– Dihidropteroato sintetase
<b>DMSO</b>	– Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	– Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i>
<b>dNMP</b>	– Desoxirribonucleótido monofosfato
<b>ddNTP</b>	– Didesoxirribonucleótido trifosfato
<b>dNTP</b>	– Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>dsDNA</b>	– Ácido desoxirribonucleico em cadeia dupla, do inglês <i>double strand DNA</i>
<b>EDTA</b>	– Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EF3</b>	– Factor de elongação 3, do inglês <i>elongation factor 3</i>
<b>EI</b>	– Expectoração induzida
<b>ELISA</b>	– Teste imunoenzimático específico, do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>E.U.A.</b>	– Estados Unidos da América
<b>EXO</b>	– Exonuclease I
<b>Q<sub>0</sub></b>	– Região de interacção entre o citocromo <i>bc1</i> e a coenzima Q.
<b>FAS</b>	– Proteína trifuncional responsável pela síntese de ácido fólico, do inglês <i>folic acid synthesis</i>
<b>FAM</b>	– 6-Carboxifluoresceína
<b>Fc-γ</b>	– Receptor Fc <i>gamma</i>
<b>f. sp.</b>	– <i>Formae specialis</i>
<b>g</b>	– Grama
<b>g</b>	– Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
<b>GM-CSF</b>	– Factor de estimulação de activação de macrófagos, do inglês <i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
<b>GMS</b>	– Coloração pela metenamina prata, do inglês <i>Gomori methenamine silver stain</i>
<b>H<sup>+</sup></b>	– Ião hidrogénio
<b>HAART</b>	– Terapêutica anti-retrovírica potente, do inglês <i>Highly Active AntiRetroviral Therapy</i>
<b>HCl</b>	– Ácido clorídrico

<b>IF</b>	– Imunofluorescência
<b>IFI</b>	– Imunofluorescência indirecta
<b>IgG</b>	– Imunoglobulina do tipo G
<b>IgM</b>	– Imunoglobulina do tipo M
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	– Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b>	– Interleucina 6
<b>IL-8</b>	– Interleucina 8
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	– Interferão gama
<b>ITS</b>	– Espeçadores internos transcritos, do inglês <i>internal transcribed spacers</i> , do operão nuclear do RNA ribossómico
<b>JOE</b>	– 7-Amino-4-metilcoumarina
<b>Kb</b>	– Quilobases
<b>kDa</b>	– Quilodaltons
<b>kV</b>	– Quilovolt
<b>KEX1</b>	– Protease sérica, do inglês <i>kexin-like serine protease</i>
<b>L</b>	– Litro
$\lambda$	– Lambda
<b>LBA</b>	– Lavado broncoalveolar
<b>LDH</b>	– Desidrogenase láctica, do inglês <i>lactate dehydrogenase</i>
<b>LO</b>	– Lavado oral
<b>mg</b>	– Miligrama
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	– Ião magnésio
<b>Mb</b>	– Milhões de pares de bases
<b>MIP2</b>	– Proteína inflamatória de macrófago 2, do inglês <i>macrophage inflammatory protein 2</i>
<b>MGB</b>	– Sonda de ligação, do inglês <i>minor-groove binding probe</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	– Cloreto de magnésio
<b>ml</b>	– Mililitro
<b>MLG</b>	– Genótipo multilocus, do inglês <i>multilocus genotype</i>
<b>mm</b>	– Milímetro
<b>mM</b>	– Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	– Milímetro cúbico

<b>mmHg</b>	– Milímetros de mercúrio
<b>mRNA</b>	– Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>
<b>MSG</b>	– Glicoproteínas major de superfície, do inglês <i>major surface glycoproteins</i>
<b>mtLSU rRNA</b>	– Subunidade grande do RNA ribossômico mitocondrial, do inglês <i>mitochondrial large subunit ribosomal RNA</i>
<b>mtSSU rRNA</b>	– Subunidade pequena do RNA ribossômico mitocondrial, do inglês <i>mitochondrial small subunit ribosomal RNA</i>
<b>N</b>	– Número
<b>NAD</b>	– Nicotinamida adenina dinucleótido, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NADPH</b>	– Nicotinamida adenina dinucleótido hidrofosfato, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide hydro phosphate</i>
<b>(NF)-kB</b>	– Factor de transcrição nuclear, do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
<b>NJ</b>	– Método de análise de semelhanças, do inglês <i>Neighbour Joining</i>
<b>ng</b>	– Nanograma
<b>nm</b>	– Nanómetro
<b>nmol</b>	– Nanomol
<b>nt</b>	– Nucleótido
<b>O<sub>2</sub></b>	– Oxigénio molecular
<b>OLA</b>	– Técnica de hibridação por sondas de ligação, do inglês <i>oligonucleotide ligation assay</i>
<b>OH</b>	– Grupo hidroxilo
<b>OMS</b>	– Organização Mundial de Saúde
<b>P</b>	– Probabilidade
<b>PABA</b>	– Ácido para-aminobenzóico, do inglês <i>para-aminobenzoic acid</i>
<b>PaO<sub>2</sub></b>	– Pressão parcial do oxigénio
<b>pb</b>	– Pares de base
<b>PBS</b>	– Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCA</b>	– Análise de componentes principais, do inglês <i>principal componente analysis</i>

<b>PCR</b>	– Reacção de polimerização em cadeia, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PFGE</b>	– Electroforese em campo pulsado, do inglês <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>
<b>PPc</b>	– Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
<b>PRT</b>	– Protease sérica de superfície
<b>RFLP</b>	– Análise de fragmentos de restrição, do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i>
<b>rfu</b>	– Unidade relativa de fluorescência, do inglês <i>relative fluorescence unit</i>
<b>RNA</b>	– Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
<b>ROX</b>	– 6-Carboxilo-X-rodamina
<b>rRNA</b>	– Ácido ribonucleico ribossómico, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
<b>RT-PCR</b>	– Reacção de polimerização em cadeia em tempo real, do inglês <i>real time polymerase chain reaction</i>
<b>SAP</b>	– Fosfatase alcalina isolada de camarão, do inglês <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
<b>SBE</b>	– Reacção de polimerização de base única, do inglês <i>single base extension</i>
<b>SCID</b>	– Imunodeficiência severa combinada, do inglês <i>Severe combined immunodeficiency</i>
<b>Sida</b>	– Síndrome de imunodeficiência adquirida
<b>SMZ</b>	– Sulfametoxazol
<b>SNP</b>	– Polimorfismo de base única, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
<b>SOD</b>	– Superóxido dismutase
<b>SPSS</b>	– Programa informático de análise estatística, do inglês <i>statistical package for social sciences</i>
<b>SSCP</b>	– Análise de polimorfismos por conformação de DNA em cadeia simples, do inglês <i>single strand conformation polymorphism</i>
<b>T<sub>A</sub></b>	– Temperatura de hibridação, do inglês <i>annealing temperature</i>
<b>TAE</b>	– Tampão tris-acetato-EDTA
<b>TAG</b>	– Sequência oligonucleótida de marcação
<b>TAMRA</b>	– 6-Carboxitetrametilrodamina



<b>TATA</b>	– Sequência característica da região promotora de genes, constituída por timina e adenina
<b>TBE</b>	– Tampão tris-Borato-EDTA
<b>TCD4<sup>+</sup></b>	– Linfócitos T com receptores do agrupamento de diferenciação 4, do inglês <i>cluster of differentiation 4</i>
<b>TCD8<sup>+</sup></b>	– Linfócitos T com receptores do agrupamento de diferenciação 8, do inglês <i>cluster of differentiation 8</i>
<b>TE</b>	– Tampão tris-HCl-EDTA
<b>TLR2</b>	– Receptor do tipo <i>toll 2</i> , do inglês <i>toll-like receptor 2</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	– Factor de necrose tumoral alfa
<b>Tris-HCL</b>	– Tris(hidroximetilo)aminometano-ácido clorídrico
<b>tRNA</b>	– Ácido ribonucleico de transcrição, do inglês <i>transcription ribonucleic acid</i>
<b>TRR</b>	– Tiorredoxina reductase
<b>TS</b>	– Timidilato sintetase
<b>TMP</b>	– Trimetoprim
<b>U</b>	– Unidade
<b>UDG</b>	– Uracilo-DNA glicosidase
<b>UCS</b>	– Região conservada, do inglês <i>upstream conserved region</i>
<b>UTR</b>	– Região não transcrita, do inglês <i>untranslated region</i>
<b>UV</b>	– Ultravioleta
<b>V</b>	– Volt
<b>VIH</b>	– Vírus da imunodeficiência humana
<b>W</b>	– Watt
<b><math>\chi^2</math></b>	– Teste do Chi-quadrado
<b><math>\mu</math>l</b>	– Microlitro
<b><math>\mu</math>m</b>	– Micrómetro

## Índice geral

	Página
Agradecimentos .....	ix
Publicações .....	xi
Resumo .....	xv
Abstract .....	xix
Lista de abreviaturas .....	xxiii
Índice geral .....	xxix
Índice de figuras .....	xxxv
Índice de quadros .....	xxxvii

### **PRIMEIRA PARTE**

(Introdução aos conceitos actuais sobre <i>Pneumocystis jirovecii</i> e pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> ) .....	1
<b>1. Introdução geral .....</b>	<b>3</b>
1.1. Perspectiva histórica .....	3
1.2. Perspectiva actual .....	5
<b>2. Morfologia e ciclo de vida .....</b>	<b>6</b>
2.1. Introdução ao ciclo de vida de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	6
2.2. Trofozoíto ou forma trófica .....	9
2.3. Pré-quisto ou esporocisto .....	10
2.3. Quisto ou esporo .....	11
<b>3. Taxonomia .....</b>	<b>14</b>
3.1. Caracterização taxonómica: <i>Pneumocystis</i> , de protozoário a fungo ....	14
3.2. Heterogeneidade genética .....	18
<b>4. Metabolismo, bioquímica e características de superfície .....</b>	<b>23</b>
4.1. Introdução ao metabolismo geral de <i>Pneumocystis</i> .....	23
4.2. Hidratos de carbono .....	24
4.3. Lípidos .....	25
4.4. Proteínas .....	25
4.5. Propriedades antigénicas de superfície .....	26

<b>5. Epidemiologia da infecção por <i>Pneumocystis jirovecii</i></b>	<b>28</b>
5.1. Prevalência	28
5.1.1. Preponderância da pneumocistose nos países ocidentais industrializados	28
5.1.2. Preponderância da pneumocistose nos países em vias de desenvolvimento	30
5.1.3. Preponderância da pneumocistose nos doentes seronegativos para VIH	31
5.2. Transmissão e reservatórios naturais	32
5.3. Latência <i>versus</i> reinfeção	35
<b>6. Apresentação clínica da pneumocistose</b>	<b>38</b>
6.1. Introdução à infecção por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	38
6.2. Infecção pulmonar por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	39
6.3. Infecção extrapulmonar por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	40
<b>7. Fisiopatologia</b>	<b>42</b>
7.1. Interação parasita-hospedeiro	42
7.2. Resposta imunitária	43
7.2.1. Imunidade celular	43
7.2.2. Imunidade humoral	48
<b>8. Diagnóstico</b>	<b>49</b>
8.1. Introdução ao diagnóstico da pneumocistose	49
8.2. Diagnóstico presuntivo	50
8.3. Diagnóstico definitivo	52
8.3.1. Amostras clínicas	52
8.3.2. Métodos histoquímicos para pesquisa directa	53
8.3.3. Métodos imuno-específicos	54
8.3.4. Métodos moleculares	55
<b>9. Prevenção e tratamento da pneumocistose</b>	<b>58</b>
9.1. Introdução às opções terapêuticas	58
9.2. Profilaxia da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	58
9.3. Tratamento da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	60

## **SEGUNDA PARTE**

**(Potencial implicação de múltiplos marcadores polimórficos de  
*Pneumocystis jirovecii* na apresentação e evolução clínica da PPc) .....65**

<b>10. Relação entre polimorfismos de <i>Pneumocystis jirovecii</i> e parâmetros clínicos da PPc .....</b>	<b>67</b>
10.1. O problema e o método .....	67
10.2. Objectivos gerais .....	69
<b>11. Avaliação da diversidade genética de <i>Pneumocystis jirovecii</i>: selecção de alvos moleculares .....</b>	<b>71</b>
11.1. Diversidade intra-específica de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	71
11.2. Introdução à epidemiologia molecular de <i>Pneumocystis jirovecii</i> ....	74
11.3. Diversidade genética dos alvos moleculares seleccionados .....	76
11.3.1. Genes mitocondriais .....	77
11.3.2. Genes nucleares .....	81
11.3.3. Genes implicados em fenómenos de resistência aos fármacos da família das sulfas .....	85
11.3.4. Genes relacionados com propriedades de superfície .....	89
11.4. Material e métodos .....	94
11.4.1. Critérios de inclusão .....	95
11.4.2. População estudada .....	96
11.4.3. Processamento das amostras de secreções pulmonares .....	96
11.4.4. Diagnóstico parasitológico de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	98
11.4.5. Extracção de DNA .....	100
11.4.6. Diagnóstico molecular de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	101
11.4.7. Caracterização genética das regiões de interesse .....	105
11.4.8. Informação clínica .....	111
11.4.9. Análise dos resultados .....	112
11.5. Resultados .....	115
11.5.1. Análise da variação genética das regiões de interesse .....	115
11.5.2. Variabilidade genética de <i>Pneumocystis jirovecii</i> e parâmetros clínicos da pneumocistose .....	122

11.5.3. Análise de componentes principais .....	130
11.5.4. Estudo da distribuição de genótipos e critérios de clonalidade .....	130
11.6. Discussão dos resultados .....	137
11.6.1. Variabilidade e distribuição dos genótipos de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	137
11.6.2. Relação entre os genótipos de <i>Pneumocystis jirovecii</i> e os parâmetros da infecção .....	144
11.6.3. Genética da população .....	148
<b>12. Desenvolvimento de metodologias de alto rendimento para análise de polimorfismos de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....</b>	<b>150</b>
12.1. Importância da PCR <i>multiplex</i> /SBE associada à técnica de DNA <i>pooling</i> para genotipagem de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	150
12.2. PCR <i>multiplex</i> .....	152
12.3. Técnica de <i>single base extension</i> (SBE) .....	157
12.4. <i>Pools</i> de DNA .....	160
12.5. Material e métodos .....	165
12.5.1. Selecção das amostras .....	165
12.5.2. Amplificação de múltiplos marcadores polimórficos por PCR <i>multiplex</i> .....	168
12.5.3. Genotipagem de múltiplos SNPs por SBE .....	169
12.5.4. Aplicação da técnica de DNA <i>pooling</i> para genotipagem de SNPs por PCR <i>multiplex</i> /SBE .....	174
12.6. Resultados .....	180
12.6.1. Análise da amplificação de três <i>loci</i> de <i>Pneumocystis jirovecii</i> por PCR <i>multiplex</i> .....	180
12.6.2. Análise da genotipagem de múltiplos SNPs por SBE .....	182
12.6.3. Análise da genotipagem por PCR <i>multiplex</i> /SBE em <i>pools</i> de DNA .....	188
12.7. Discussão dos resultados .....	198
12.7.1. Validação da genotipagem de SNPs de	

<i>Pneumocystis jirovecii</i> por PCR <i>multiplex</i> /SBE .....	199
12.7.2. Avaliação da genotipagem de <i>Pneumocystis jirovecii</i> por PCR <i>multiplex</i> /SBE em <i>pools</i> de DNA .....	199
<b>13. Discussão geral e perspectivas futuras .....</b>	<b>211</b>
13.1. Discussão geral .....	211
13.2. Perspectivas futuras .....	215
<b>14. Referências bibliográficas .....</b>	<b>217</b>
<b>Anexos</b>	



## Índice de figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Secção de alvéolo pulmonar infectado por <i>Pneumocystis</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Pneumocystis jirovecii</i> no alvéolo pulmonar .....	8
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das principais estruturas da forma trófica de uma célula de <i>P. jirovecii</i> .....	10
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das principais estruturas da forma quística de uma célula de <i>P. jirovecii</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática abreviada da classificação taxonómica de <i>Pneumocystis</i> .....	18
<b>Figura 6.</b> Máxima probabilidade filogenética de <i>Pneumocystis</i> isolados de 12 hospedeiros diferentes .....	22
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática da composição da parede celular de <i>P. jirovecii</i> .....	26
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica dos resultados de um estudo epidemiológico efectuado às taxas de infecções oportunistas, realizado pelo CDC .....	29
<b>Figura 9.</b> Diagrama que demonstra a importância das células TCD4 <sup>+</sup> na resposta imunitária à infecção por <i>Pneumocystis</i> .....	43
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática da infecção e da resposta inata celular ao agente infeccioso <i>P. jirovecii</i> .....	45
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática das interacções entre <i>P. jirovecii</i> e um macrófago alveolar .....	46
<b>Figura 12.</b> Quistos de <i>P. jirovecii</i> , corados por duas técnicas de referência, em secreções pulmonares .....	54
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática da cadeia respiratória e da acção da superóxido dismutase dependente de manganésio .....	79



<b>Figura 14.</b> Representação esquemática da via biossintética do ácido fólico e da acção de inibição do sulfametoxazol e do trimetoprim .....	85
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática do modelo de expressão das glicoproteínas de superfície (MSGs) de <i>P. jirovecii</i> .....	91
<b>Figura 16.</b> Representação gráfica de três análises de componentes principais mais informativas .....	131
<b>Figura 17.</b> Dendrograma das relações entre os MLGs de <i>P. jirovecii</i> , elaborado com base nos marcadores nucleares estudados .....	135
<b>Figura 18.</b> Esquema representativo da técnica de SBE utilizada para a genotipagem de SNPs de <i>P. jirovecii</i> .....	160
<b>Figura 19.</b> Esquema representativo da técnica de <i>DNA pooling</i> utilizada para a identificação de polimorfismos de <i>P. jirovecii</i> .....	163
<b>Figura 20.</b> Fotografia dos produtos de PCR <i>multiplex</i> de isolados de <i>P. jirovecii</i> , após separação por electroforese em gel de agarose .....	181
<b>Figura 21.</b> Esquema representativo da técnica de SBE em <i>multiplex</i> utilizada para a identificação dos SNPs de <i>P. jirovecii</i> em estudo .....	183
<b>Figura 22.</b> Fotografia dos produtos de SBE de isolados de <i>P. jirovecii</i> por separação de fragmentos por electroforese em gel de acrilamida .....	184
<b>Figura 23.</b> Gráfico de genotipagem por SBE de um isolado de <i>P. jirovecii</i> através da técnica de sequenciação por electroforese capilar .....	185
<b>Figura 24.</b> Gráfico da curva de calibração fornecida pela fluorescência das diluições de DNA de fago $\lambda$ com concentrações conhecidas .....	190
<b>Figura 25.</b> Gráfico da relação entre a quantidade de DNA das diluições do padrão do gene <i>KEX1</i> de <i>P. jirovecii</i> e os respectivos $C_T$ .....	192
<b>Figura 26.</b> Representação gráfica dos $C_T$ médios dos isolados individuais calculados através da <i>KEX1</i> RT-PCR para os <i>pools</i> A1, A2 e A3 .....	193

## Índice de quadros

	Página
<b>Quadro I.</b> Exemplos da nomenclatura trinomial para <i>Pneumocystis carinii</i> .....	20
<b>Quadro II.</b> Alvos metabólicos dos principais fármacos utilizados no tratamento da pneumocistose .....	63
<b>Quadro III.</b> Características genéticas e genes de <i>P. jirovecii</i> .....	76
<b>Quadro IV.</b> Variações nucleotídicas descritas para o gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	78
<b>Quadro V.</b> Variações nucleotídicas identificadas para o gene que codifica para o citocromo <i>b</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	80
<b>Quadro VI.</b> SNPs descritos para o gene de <i>P. jirovecii</i> , que codifica para a superóxido dismutase dependente de manganésio .....	82
<b>Quadro VII.</b> Variações nucleotídicas descritas para o gene de <i>P. jirovecii</i> que codifica para a $\beta$ -tubulina .....	82
<b>Quadro VIII.</b> Variações nucleotídicas, detectadas em Portugal, para o gene <i>DHFR</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	87
<b>Quadro IX.</b> Variações nucleotídicas mais estudadas no gene <i>DHPS</i> de <i>P. jirovecii</i> (codões 55 e 57) .....	89
<b>Quadro X.</b> Descrição das sequências de repetição localizadas no intrão da região <i>UCS</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	91
<b>Quadro XI.</b> Variações nucleotídicas descritas para a sequência conservada <i>UCS</i> localizada nas regiões subteloméricas de <i>P. jirovecii</i> .....	92
<b>Quadro XII.</b> Critério para a determinação da carga parasitária dos isolados de <i>P. jirovecii</i> , englobados no presente estudo .....	99
<b>Quadro XIII.</b> Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> por PCR <i>nested</i> .....	103

<b>Quadro XIV.</b> Condições térmicas aplicadas na PCR <i>nested</i> para amplificação do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	104
<b>Quadro XV.</b> Sequências nucleotídicas e características dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciação directa dos genes de interesse ...	106
<b>Quadro XVI.</b> Condições das reacções de PCR dos genes <i>mtLSU rRNA</i> , <i>CYB</i> , <i>SOD</i> , $\beta$ <i>TUB</i> , <i>TRR1</i> , <i>TS</i> , <i>DHFR</i> , <i>UCS</i> e <i>KEX1</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	107
<b>Quadro XVII.</b> Condições térmicas de amplificação do gene <i>DHPS</i> de <i>P. jirovecii</i> , por PCR <i>nested</i> .....	108
<b>Quadro XVIII.</b> Informação clínica e parâmetros da doença correspondentes aos isolados de <i>P. jirovecii</i> dos doentes envolvidos no estudo .....	116
<b>Quadro XIX.</b> SNPs detectados no gene <i>mtLSUrRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	117
<b>Quadro XX.</b> SNPs detectados no gene <i>CYB</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	118
<b>Quadro XXI.</b> SNPs detectados no gene <i>SOD</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	118
<b>Quadro XXII.</b> SNPs detectados no gene $\beta$ <i>TUB</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	119
<b>Quadro XXIII.</b> SNP detectado no gene <i>TRR1</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	119
<b>Quadro XXIV.</b> SNPs detectados no gene <i>DHFR</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	120
<b>Quadro XXV.</b> SNPs detectados no gene <i>DHPS</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	120
<b>Quadro XXVI.</b> SNPs detectados na região <i>UCS</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	121
<b>Quadro XXVII.</b> SNPs detectados no gene <i>KEX1</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	122
<b>Quadro XXVIII.</b> Correlações estatísticas entre SNPs dos 10 <i>loci</i> em estudo (frequências dos SNPs e níveis de significância) .....	123
<b>Quadro XXIX.</b> Distribuição dos genótipos de <i>P. jirovecii</i> mais relevantes em relação à idade e ao género dos doentes .....	125
<b>Quadro XXX.</b> Distribuição dos genótipos de <i>P. jirovecii</i> mais relevantes no que se refere à carga parasitária e à contagem de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> ...	126

<b>Quadro XXXI.</b> Distribuição dos genótipos de <i>P. jirovecii</i> mais relevantes no que se refere ao diagnóstico clínico e à evolução da infecção .....	127
<b>Quadro XXXII.</b> Distribuição dos genótipos de <i>P. jirovecii</i> mais relevantes no que se refere à profilaxia e terapêutica anti- <i>P. jirovecii</i> .....	128
<b>Quadro XXXIII.</b> Distribuição dos genótipos de <i>P. jirovecii</i> mais relevantes nos três grupos considerados de doentes seropositivos para VIH ...	129
<b>Quadro XXXIV.</b> Resultados do cálculo do teste recombinatório d1 para os MLGs de <i>P. jirovecii</i> isolado de doentes seropositivos para VIH .....	134
<b>Quadro XXXV.</b> Condições dos ciclos de amplificação da PCR <i>multiplex</i> dirigida aos genes <i>mtLSU rRNA</i> , <i>SOD</i> e <i>DHFR</i> de <i>P. jirovecii</i> .....	169
<b>Quadro XXXVI.</b> Sequências nucleotídicas dos SBE-TAG <i>primers</i> utilizados na reacção de SBE .....	170
<b>Quadro XXXVII.</b> Condições da reacção de SBE para detecção dos SNPs <i>mt85</i> , <i>SOD110</i> , <i>SOD215</i> e <i>DHFR312</i> .....	172
<b>Quadro XXXVIII.</b> Sequências dos <i>primers</i> e da sonda TaqMan MGB utilizados para quantificação de DNA de <i>P. jirovecii</i> por RT-PCR .....	175
<b>Quadro XXXIX.</b> Condições térmicas aplicadas na <i>KEX1</i> RT-PCR, para detecção e quantificação de DNA de <i>P. jirovecii</i> .....	176
<b>Quadro XL.</b> Comparação dos resultados obtidos de acordo com a técnica de sequenciação directa e as duas técnicas de SBE utilizadas .....	187
<b>Quadro XLI.</b> Resultados das reacções de <i>KEX1</i> RT-PCR de três amostras testadas com diferentes diluições .....	188
<b>Quadro XLII.</b> Resultados de quantificação de diluições seriadas de DNA de fago $\lambda$ pelo método do PicoGreen .....	189
<b>Quadro XLIII.</b> Concentrações de DNA de <i>P. jirovecii</i> nas diversas diluições da amostra padrão e respectivos $C_T$ .....	191

<b>Quadro XLIV.</b> Concentrações médias de DNA e C <sub>T</sub> médios determinados para os isolados de <i>P. jirovecii</i> dos subgrupos em estudo .....	192
<b>Quadro XLV.</b> Concentrações de DNA de <i>P. jirovecii</i> nos diferentes <i>pools</i> em estudo .....	194
<b>Quadro XLVI.</b> Frequências dos SNPs de <i>P. jirovecii</i> nos <i>pools</i> em estudo .....	195
<b>Quadro XLVII.</b> Resultados do teste <i>t</i> referentes à comparação da distribuição das frequências dos SNPs de <i>P. jirovecii</i> nos <i>pools</i> em estudo ..	196





## **PRIMEIRA PARTE**

**Introdução aos conceitos actuais sobre *Pneumocystis jirovecii* e  
pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*.**





## 1. Introdução geral

### 1.1. Perspectiva histórica

*Pneumocystis jirovecii* [Frenkel 1976; Redhead *et al.* 2006], anteriormente designado por *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* [Stringer *et al.* 2001; Stringer *et al.* 2002] é um agente patogénico oportunista que provoca, em regra, pneumonia intersticial severa, conhecida por pneumocistose ou, pneumonia por *P. jirovecii* (PPc), em imunocomprometidos [Wakefield 2002; Morris *et al.* 2004; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Beck & Cushion 2009]. Este eucariota unicelular, de distribuição ubíqua, permanece como um significativo factor de morbilidade e mortalidade em seropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH), mesmo na era da terapêutica anti-retrovírica potente (HAART, do inglês *Highly Active AntiRetroviral Therapy*) [Kovacs *et al.* 2001; Barry & Johnson 2001; Thomas, Jr. & Limper 2007; Walzer *et al.* 2008].

*Pneumocystis* foi descoberto por Carlos Chagas (Brasil) no início de século XX, mais precisamente em 1909, sendo nesta altura considerado uma etapa do ciclo de vida de *Tripanosoma cruzi* [Chagas 1909]. Um ano após Chagas ter observado o microrganismo no pulmão de um cobaio, António Carini, também no Brasil, ao estudar o pulmão de um rato, reconheceu e identificou uma estrutura que parecia ser o mesmo microrganismo. Em 1912, no Instituto Pasteur (Paris), um estudo mais aprofundado, sobre o material biológico proveniente das investigações de Carini, foi conduzido pelo casal Delanoë. Estes investigadores chegaram à conclusão de que o organismo em questão era claramente distinto de *T. cruzi* e, desde logo, atribuíram-lhe a designação de *Pneumocystis*, por ter sido isolado no pulmão, e o restritivo específico *carinii*, homenageando António Carini, que havia proporcionado a investigação [Delanoë & Delanoë 1912]. Assim, os organismos do género *Pneumocystis* foram descritos como pequenas estruturas, densas e altamente refringentes, em forma de quistos esféricos [Vavra & Kucera 1970; Stringer 1996; Cushion 2004; Thomas, Jr. & Limper 2007].

Durante as décadas que se seguiram, foram encontrados microrganismos sob a forma de quistos muito similares aos definidos pelo casal Delanoë, verificando-se que a sua ocorrência poderia estar associada a casos de pneumonia num alargado leque de espécies de mamíferos [Stringer *et al.* 1992; Aliouat-Denis *et al.* 2008]. *Pneumocystis* foi reconhecido como potencial agente infeccioso, quando nas décadas de 30 e 40, do

século passado, lhe foram atribuídos vários casos de pneumonia intersticial em crianças desnutridas e prematuras, muitas delas acolhidas em orfanatos, como resultado da segunda guerra mundial [Gajdusek 1976; Wakefield 2002; Cushion 2004]. No entanto, somente no decorrer dos anos 50, do mesmo século, os estudos de Vanek e Jírovec demonstraram e estabeleceram as características infecciosas de *Pneumocystis* no Homem [Frenkel 1999; Stringer *et al.* 2002]. Tornou-se evidente que os doentes que desenvolviam PPc demonstravam características clínicas comuns, que, de alguma forma, eram consequência de sistemas imunitários débeis, quer por causa de anomalias congénitas, como a hipogamaglobulinemia, quer pela acção de fármacos imunossupressores, quer, ainda, por subnutrição, no caso de serem crianças [Cushion 2004].

Na década de 70, do século XX, quando este agente infeccioso se tornou causa frequente de pneumonia em doentes imunocomprometidos, retomou-se o estudo mais aprofundado da PPc, devendo-se então este facto ao aumento considerável do número de doentes portadores de situações de imunodepressão grave, em particular receptores de órgãos transplantados, sujeitos a imunossupressão iatrogénica induzida, e doentes oncológicos, sujeitos a quimioterapia e radioterapia [Matsumoto & Yoshida 1986; Stringer 1996; Wakefield 2002; Thomas, Jr. & Limper 2007]. Ainda durante os anos 70, do século passado, foi desenvolvida uma combinação de fármacos, o trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ), que demonstrou ser eficaz no tratamento contra a infecção por *P. jirovecii*, permitindo um maior controlo da pneumocistose, e o melhor acompanhamento do quadro clínico dos doentes [Hughes *et al.* 1974; Sattler *et al.* 1988].

Com a epidemia da síndrome de imunodeficiência adquirida (sida), no início dos anos 80, a pneumocistose, tornou-se numa das preocupações fundamentais no seguimento dos doentes seropositivos para VIH [Moe & Hardy 1994; Wakefield 2002; Walzer *et al.* 2008]. Antes de ser instituída profilaxia eficaz, 80% dos doentes, infectados por este vírus, desenvolvia, pelo menos, um episódio de PPc no decorrer da infecção que, em 60% dos casos representava a doença definidora de sida e, que para 20 a 25% destes doentes era mortal [Kovacs *et al.* 1984; Dei-Cas 2000; Barry & Johnson 2001; Morris *et al.* 2004].

Nos últimos anos, os investigadores conseguiram progressos significativos na profilaxia, no tratamento e no diagnóstico da PPc, proporcionando desta forma um aumento da esperança média de vida dos doentes com sida. Nos países industrializados, o uso generalizado de quimioprofilaxia, estabelecido no início dos anos 90, do século passado, e a introdução da HAART, em meados da mesma década, permitiram o decréscimo na incidência da PPc. Contudo, a pneumocistose, permanece como um problema clínico importante, sendo uma das principais infecções oportunistas que afectam os doentes seropositivos para VIH [Kovacs *et al.* 2001; Morris *et al.* 2004; Cushion 2004]. Por outro lado, actualmente, parte dos casos de PPc, ilustram desigualdades no acesso aos cuidados médicos de algumas populações, ou grupos sociais, em várias regiões do globo, nos quais, é complicado o diagnóstico atempado e eficaz da infecção por VIH, que, muitas das vezes, é feito quando os doentes apresentam já um quadro sintomático [Morris *et al.* 2004; Walzer *et al.* 2008].

## **1.2. Perspectiva actual**

Actualmente, a inexistência de um processo sustentado de cultivo de *P. jirovecii* é uma importante limitação nas várias áreas de estudo da PPc [Stringer 1996; Wakefield 2002]. No entanto, a evolução e o aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico clássicos e a aplicação das novas técnicas na área da biologia molecular vieram permitir, não só, a melhoria na identificação de *P. jirovecii* em amostras clínicas, como também, o estudo da heterogeneidade genética inter e intra-hospedeiros. Estas ferramentas possibilitam a identificação de diferentes tipos de *P. jirovecii* e o reconhecimento de determinadas características moleculares associadas ao perfil epidemiológico e parâmetros clínicos específicos da PPc, tais como a distribuição geográfica, resistência a fármacos, graus de severidade da infecção e modos de transmissão [Stringer & Walzer 1996; Matos 1999; Kovacs *et al.* 2001; Barry & Johnson 2001; Cushion 2004; Costa 2006; Thomas, Jr. & Limper 2007; Beck & Cushion 2009].

## 2. Morfologia e ciclo de vida

### 2.1. Introdução ao ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii*

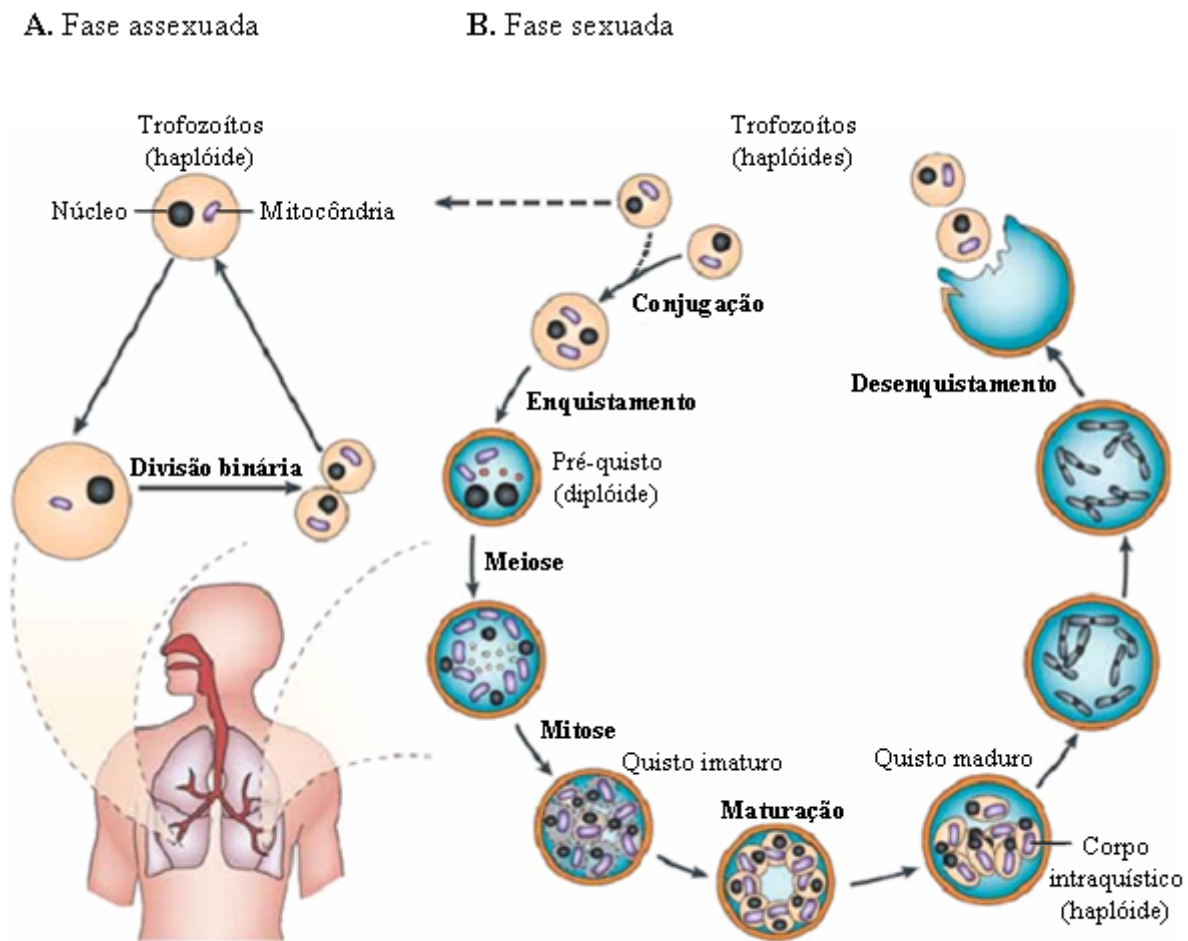
*Pneumocystis* é considerado um agente com distribuição ubíqua, encontrado, com frequência, numa grande variedade de mamíferos, incluindo o Homem. Ocasionalmente, este patogénico oportunista é causador de infecção, em particular nos hospedeiros imunocomprometidos, manifestando-se por uma pneumonia severa. Nestes hospedeiros, *Pneumocystis* tem a capacidade de se fixar, especificamente, às células epiteliais do tipo I do alvéolo pulmonar (pneumócitos do tipo I), onde se desenvolve progressivamente, preenchendo as cavidades alveolares, num processo que conduz à insuficiência respiratória do hospedeiro [Dei-Cas 2000; Aliouat-Denis *et al.* 2008]. Os estádios de desenvolvimento de *Pneumocystis* conhecidos, são observáveis nos alvéolos pulmonares, mas também, foram já descritos noutros órgãos [Cohen & Stoeckle 1991; Matos 1999].

As dificuldades no desenvolvimento de métodos reprodutíveis de cultivo *in vitro* têm impedido o progresso do conhecimento do ciclo de vida deste microrganismo. Os estudos sobre as estruturas celulares de *Pneumocystis*, baseados na observação de tecido pulmonar infectado, com recurso à microscopia electrónica (figura 1), são considerados, pela maioria dos autores, os que melhores resultados reproduzem [Vavra & Kucera 1970; Campbell, Jr. 1972; Dei-Cas 2000; Aliouat-Denis *et al.* 2008]. A maioria destes estudos foi efectuada tendo em conta infecções em tecidos humanos e de ratos, ou culturas de curta duração de *Pneumocystis* isolados a partir do pulmão. A nível experimental, não se verificaram diferenças morfológicas entre *Pneumocystis* de rato e de humanos [Ruffolo 1994].



**Figura 1.** Secção de alvéolo pulmonar infectado por *Pneumocystis*. Na imagem, obtida por microscopia electrónica (x16.000), pode observar-se um trofozoíto (T) e um quisto (Q) de *Pneumocystis* contendo seis corpos intraquísticos [Sidhu *et al.* 2003].

Três estádios morfológicos diferentes são reconhecidos no ciclo de vida de *Pneumocystis* (figura 2): o trofozoíto ou forma trófica, o pré-quisto ou em alternativa esporocisto, e o quisto, também designado por esporo. Com base nos estudos de microscopia electrónica, confirmou-se que, no alvéolo pulmonar dos hospedeiros, a forma de trofozoíto dá origem a um pré-quisto e que este evolui para um quisto com oito corpos intraquísticos, os quais por sua vez, são libertados, quando o quisto rompe. Cada corpo intraquístico origina um novo trofozoíto, que pode dividir-se por fissão binária, ou conjugar-se com outro trofozoíto, retomando-se o ciclo [Vavra & Kucera 1970; Campbell, Jr. 1972; Matsumoto & Yoshida 1986; Ruffolo *et al.* 1989; Yoshikawa & Yoshida 1989; Ruffolo 1994; de Souza W. & Benchimol 2005].



**Figura 2.** Representação esquemática do ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii* no alvéolo pulmonar. Existem duas formas predominantes no ciclo de vida de *P. jirovecii*, a forma trófica e a forma quística. É proposto que os trofozoítos (haplóides) tenham a capacidade de se multiplicarem por fissão binária, dominando a fase de reprodução assexuada (A). Os trofozoítos podem conjugar-se, dando origem a um pré-quisto (diploide), que evolui para a forma quística, numa fase de reprodução sexuada do ciclo de vida (B). Foram observados, através de microscopia electrónica, três estádios intermédios distintos da forma quística de *P. jirovecii*, contendo dois, quatro e oito núcleos, respectivamente. É sugerido que os trofozoítos emanem dos corpos intraquísticos (haplóides) dos quistos maduros, quando estes rompem [Matsumoto & Yoshida 1984; Ruffolo *et al.* 1989; Ruffolo 1994; Cushion 1998; Thomas, Jr. & Limper 2007] (adaptado de Cushion 1998; Thomas, Jr. & Limper 2007).

## 2.2. Trofozoíto ou forma trófica

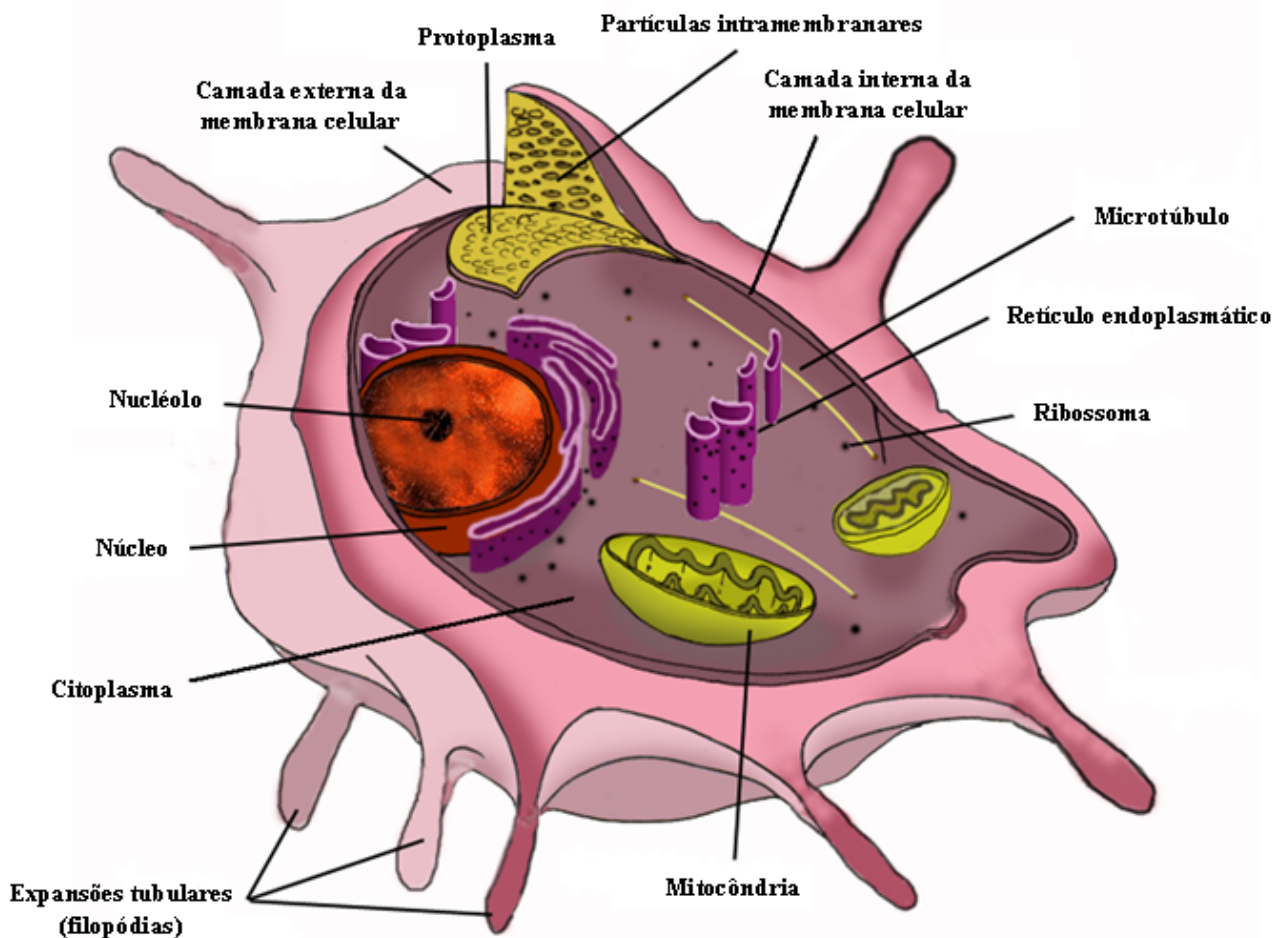
Entre 1984 e 1986, Matsumoto e Yoshida [Matsumoto & Yoshida 1984; Yoshida *et al.* 1984; Matsumoto & Yoshida 1986], recorrendo ao estudo ultraestrutural, descreveram o ciclo de vida de *Pneumocystis*, com duas fases, uma assexuada, onde os trofozoítos haplóides se multiplicavam por divisão celular, e outra sexuada, onde se poderia observar a formação de corpos quísticos. Em 1989, Yoshida [Yoshida 1989] reviu e confirmou o ciclo de vida de *Pneumocystis* como um ciclo sexuado que começa com a ruptura de um quisto maduro e a consequente libertação e desenvolvimento dos trofozoítos.

Paralelamente, os trofozoítos, ou formas tróficas, células haplóides, podem multiplicar-se, de forma alternativa, através de um ciclo assexuado, por divisão binária ou por endogenia. Disseminados no alvéolo pulmonar, os trofozoítos, representam a forma vegetativa do microrganismo, correspondendo a pequenas formas haplóides que podem ser identificadas livres, em secreções broncoalveolares, fagocitadas por macrófagos ou ligadas aos pneumócitos do tipo I [Yoneda & Walzer 1983; Ruffolo 1994; Weaver *et al.* 1996]. Trata-se de uma célula que apresenta uma forma redonda, ou elipsóide, medindo cerca de 2 µm de diâmetro, quando recém-libertada do quisto (trofozoíto jovem).

Com a maturação, o trofozoíto atinge os 3-5 µm, adquirindo uma forma mais irregular, tornando-se uma célula polimórfica (amebóide ou pleomórfica) à medida que envelhece. O trofozoíto maduro, possui um núcleo excêntrico com um nucléolo de pequenas dimensões e uma membrana celular fina, com 20-50 nm de espessura, rica em colesterol, o que influencia a sua fluidez. Esta membrana apresenta duas camadas distintas, uma camada interna uniforme (membrana plasmática) (35 nm), e uma camada externa (15 nm), rica em antigénios de superfície e, provavelmente, com importantes funções na regulação osmótica e no transporte de macromoléculas. Nesta fase, o trofozoíto maduro apresenta estruturas características, finas e de tamanho variado que se traduzem por saliências que irrompem da parede celular (filopódias). Estas expansões tubulares fornecem um aspecto felpudo à camada externa da membrana celular e estão, muito provavelmente, ligadas à fixação do trofozoíto aos pneumócitos do tipo I e/ou à captura de nutrientes para a célula de *Pneumocystis* [Matsumoto & Yoshida 1986;



Ruffolo *et al.* 1989; De Stefano *et al.* 1990a; Ruffolo 1994]. As inclusões citoplasmáticas características dos trofozoítos estão representadas na figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática das principais estruturas da forma trófica de uma célula de *P. jirovecii* (adaptado de de Souza W. & Benchimol 2005).

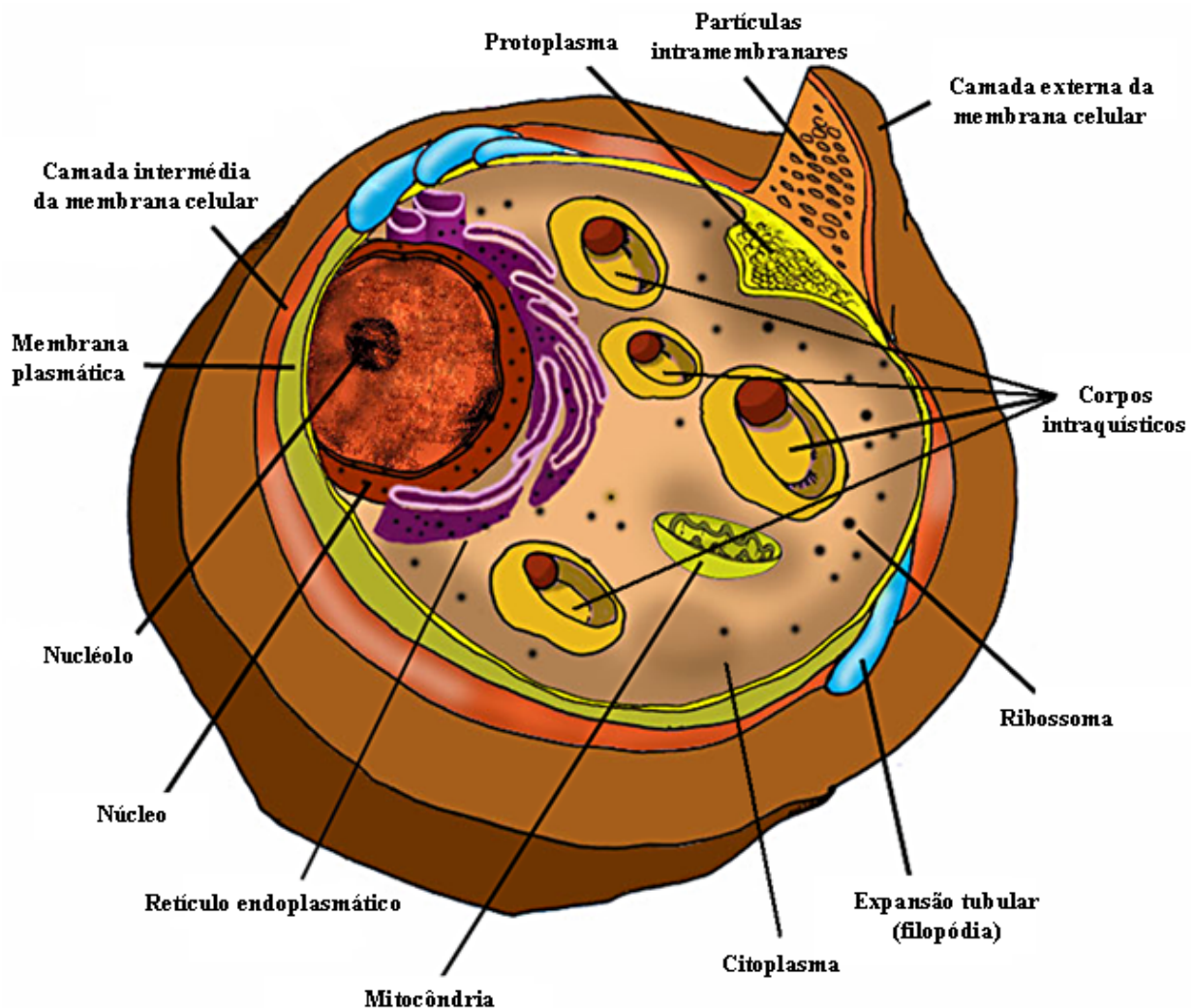
### 2.3. Pré-quisto ou esporocisto

O ciclo sexuado de *Pneumocystis* tem seguimento, quando, por conjugação, dois trofozoítos maduros, dão origem a um trofozoíto diplóide [Matsumoto & Yoshida 1986]. Não se sabe, exactamente, quais os factores que conduzem ao enquistamento, ou esporogénese, todavia, uma teoria datada de 1981, propõe que o estímulo para a formação de quistos poderá ocorrer quando o alvéolo está preenchido de trofozoítos, não havendo a possibilidade de novos parasitas aderirem aos pneumócitos para obtenção de nutrientes [Hasleton *et al.* 1981].

O pré-quisto, ou esporocisto, é o estágio intermédio na transformação do trofozoíto em quisto, ou esporo, tendo sido descrito pela primeira vez por Matsumoto & Yoshida, em 1984. Trata-se de uma etapa do desenvolvimento deste microrganismo resultante de uma fase de reprodução sexuada onde a célula mãe (zigoto) enquistada. O pré-quisto tem o diâmetro de 4-5  $\mu\text{m}$  e apresenta uma forma ovóide. Com o passar do tempo, a célula desenvolve-se, ficando mais esférica. O núcleo do pré-quisto é volumoso (2  $\mu\text{m}$ ), e à superfície da célula, vão desaparecendo as extensões tubulares e a parede celular vai ficando mais espessa (40-120  $\mu\text{m}$ ), devido ao aparecimento de uma nova camada intermédia, entre a camada externa e a membrana plasmática [Vavra & Kucera 1970; Matsumoto & Yoshida 1984; Matsumoto & Yoshida 1986; Stringer *et al.* 1992; Itatani 1996]. A camada intermédia, é um espaço periplasmático com uma bateria de enzimas responsáveis pela digestão de materiais de degradação da célula, caracterizando-se pela afinidade aos corantes argênticos [Matsumoto & Yoshida 1986; Yoshida 1989; De Stefano *et al.* 1990a]. O pré-quisto sofre uma divisão meiótica, seguida de mitose e no final obtêm-se oito núcleos. Esta teoria de divisão, com ocorrência de meiose é apoiada em estudos onde foram encontrados microtúbulos e um complexo de sinaptonemas, que permite o alinhamento dos cromossomas homólogos, sendo visível na profase I da meiose [Matsumoto & Yoshida 1984; Yoshida 1989; Itatani 1996]. Os corpos intraquísticos são formados pela divisão do citoplasma através de uma invaginação da membrana citoplasmática, englobando e encerrando em si um núcleo, uma mitocôndria e vários componentes e organelos citoplasmáticos [Matsumoto & Yoshida 1986; Ruffolo *et al.* 1989; Ruffolo 1994].

#### 2.4. Quisto ou esporo

Um quisto maduro, também designado por esporo, mede cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentando forma esférica, parede celular muito espessa (120-160 nm) e poucas filopódias à superfície (figura 4). Devido à camada intermédia ser deslocada para o interior, dá-se um forte espessamento da película que envolve o quisto. A parede celular forma uma espécie de fenda, tendo ao corte a forma de cratera, observável por microscopia óptica, após coloração pela metenamina prata. Pensa-se que esta fenda possa estar, de alguma forma, relacionada com o fenómeno de desenquistamento, pois, nesta zona, localiza-se uma estrutura semelhante a um orifício.



**Figura 4.** Representação esquemática das principais estruturas da forma quística de uma célula de *P. jirovecii* (adaptado de de Souza W. & Benchimol 2005).

O quisto engloba os oito corpos intraquísticos de 1  $\mu\text{m}$  cada, dispostos em coroa, podendo apresentar três formas diferentes (esférica, elipsóide e alongada, ou amebóide), não estando ainda claro o porquê e qual a importância destas diferenças [Vavra & Kucera 1970; Campbell, Jr. 1972; Matsumoto & Yoshida 1986; Yoshida 1989]. Contudo, alguns autores sugerem que os corpos intraquísticos com forma elipsóide alongada (densa aos electrões), poderão ser estruturas de dormência do parasita, estando adaptados para a transmissão entre hospedeiros [Vavra & Kucera 1970].

Após completar-se o amadurecimento do quisto, ou esporo, este está pronto a romper. O desenquistamento, ou esporulação, é um fenómeno com contornos ainda pouco definidos, não se sabendo quais os estímulos que levam à libertação dos corpos intraquísticos, nem o modo como é formada a fenda na parede quística (a função e o processo de diferenciação desta estrutura são desconhecidos) [Ruffolo *et al.* 1989; Ruffolo 1994].

A evolução de *Pneumocystis* fora do hospedeiro mantém-se desconhecida, como tal, não se conhecem fases do ciclo de vida no ambiente. Assim, nunca foi possível isolar, observar e identificar células deste microrganismo fora dos tecidos de hospedeiros, embora já tenha sido detectado ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *desoxiribonucleic acid*) de *Pneumocystis* em amostras de água e de ar. Este facto sugere a presença do microrganismo em ambos os ambientes, o que poderá ter importância a nível dos mecanismos de transmissão da doença [Wakefield 1996; Casanova-Cardiel & Leibowitz 1997].

### 3. Taxonomia

#### 3.1. Caracterização taxonómica: *Pneumocystis*, de protozoário a fungo

Após um século de investigação, período que vai desde a descoberta do microrganismo, em 1909, até à actualidade, a classificação taxonómica de *Pneumocystis* permanece uma área de investigação controversa, não se sabendo, ainda, ao certo qual a verdadeira natureza do microrganismo. Passados 100 anos sobre a sua descoberta, permanecem as dificuldades em classificar *Pneumocystis*, principalmente porque até ao momento não se conseguiu cultivá-lo de forma estável, duradoura e reprodutível, o que inviabiliza grande parte dos estudos *in vitro* [Stringer 1996; Stringer *et al.* 2002; Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008].

*Pneumocystis* é um eucariota unicelular que infecta assintomaticamente uma variedade de hospedeiros mamíferos. Este microrganismo é causa de infecção oportunista, geralmente sob a forma de pneumonia, em imunocomprometidos. *Pneumocystis* spp. são parasitas obrigatórios, extracelulares, específicos de hospedeiro e, normalmente, localizados no tecido pulmonar dos hospedeiros. Quando, em 1909, Chagas identifica pela primeira vez o microrganismo, em pulmões de animais co-infectados com *Trypanosoma*, classifica-o como um estágio do ciclo de vida do protozoário, conhecido como *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas [Chagas 1909]. Em 1912, investigadores do Instituto Pasteur de Paris, classificaram o microrganismo, como sendo distinto de *T. cruzi*, atribuindo-lhe a designação de “*Pneumo*” pelo trofismo demonstrado em relação aos pulmões, “*cystis*” pela forma característica observada e o restritivo específico “*carinii*” em honra a António Carini, que disponibilizou as amostras sobre as quais foi efectuado o estudo [Delanoë & Delanoë 1912]. A taxonomia de *Pneumocystis* permaneceu enigmática durante décadas, conduzindo a um debate prolongado, que ainda persiste, sobre a sua classificação como protozoário ou fungo [Frenkel 1976; Stringer 2002; Cushion 2004; Redhead *et al.* 2006].

Até à década de 80 do século passado, a localização filogenética de *Pneumocystis* foi baseada nas análises morfológicas, nas necessidades bioquímicas e na resposta (susceptibilidade) a agentes quimioterapêuticos. Nos últimos anos, como consequência da aplicação das inovadoras técnicas de biologia molecular, há uma maior

tendência para localizar *Pneumocystis* no reino dos fungos. No entanto, para além de permanecer a dúvida inicial entre protozoário e fungo, surgem agora outras questões de grande interesse [Stringer 1996], tais como:

- 1) Qual é o tipo de fungo?
- 2) Qual é o espectro de variação e a heterogeneidade dentro do grupo conhecido de organismos identificados como *Pneumocystis*?
- 3) Qual é a importância de identificar, estudar e compreender esta variação para melhor interpretar comportamentos do agente causador da PPc.

Nos anos 70, do século passado, quando *Pneumocystis* se tornou uma importante causa de pneumonia em doentes imunocomprometidos, foram efectuados diversos estudos para a identificação de fármacos anti-*P. jirovecii*. Estas pesquisas demonstraram que o microrganismo não responde à anfotericina B (antifúngico de largo espectro), devido à ausência de ergosterol na sua parede celular. Porém, quando se utilizam fármacos activos contra protozoários, como a pentamidina e o TMP-SMZ, o tratamento da PPc decorre com sucesso. Esta constatação contribuiu largamente para a hipótese de *P. jirovecii* poder ser um protozoário [Hughes *et al.* 1974; Sattler *et al.* 1988; Stringer 1996]. A classificação como protozoário também é consistente com algumas características morfológicas e bioquímicas, como é o caso da morfologia dos trofozoítos, a abundante presença de colesterol e a capacidade em sintetizar folatos, sendo importante o facto das suas necessidades bioquímicas serem causa constante de insucesso no que diz respeito ao crescimento deste microrganismo em meio de cultura para fungos [Stringer *et al.* 1992; Sloand *et al.* 1993; Stringer 1996]. Há ainda a considerar fortes semelhanças na sua acção patogénica com outros protozoários. Uma característica importante que liga este microrganismo aos protozoários é o facto de mostrar uma forte variabilidade antigénica, através de um conjunto de glicoproteínas de superfície, conhecidas por glicoproteínas major de superfície, do inglês *major surface glycoproteins* (MSG), que permitem ao microrganismo evadir-se da resposta imunológica do hospedeiro, uma estratégia nunca detectada em fungos, mas comum em algumas bactérias e em determinados protozoários [Kovacs *et al.* 1993; Nakamura & Wada 1998; Kutty *et al.* 2008].

No entanto, o agente responsável pela pneumocistose é considerado um fungo, sendo esta classificação baseada em recentes análises bioquímicas e genéticas [Redhead *et al.* 2006]. Mesmo a nível morfológico, este microrganismo demonstra algumas características que o aproximam dos fungos, sendo elas as oito formas intra-quísticas, idênticas aos ascocorpos dos *Ascomycota*, conhecidos por “asci”, a proporção de dez trofozoítos para um quisto, nos pulmões dos hospedeiros, que pode ser indicadora de dominância de uma forma vegetativa, semelhante às formas vegetativas das leveduras capazes de gerar esporos (quistos), a ausência de organelos facilmente visíveis, as cristas lamelares nas mitocôndrias, observadas por microscopia electrónica, e a composição da parede quística, com quitina e  $\beta$ -glucano [Ruffolo *et al.* 1989; Matsumoto *et al.* 1989; Ruffolo 1994; Stringer 2002].

Contudo, parece tratar-se, claramente, de um fungo atípico, pois quando comparado com outros fungos patogénicos que afectam o Homem, *Pneumocystis* demonstra algumas propriedades, um tanto ou quanto, anormais. Os conceitos de trofozoíto, quisto e corpos intraquísticos não são apropriados para descrever etapas do ciclo de vida de um fungo típico unicelular, a flexibilidade e fragilidade da parede celular durante a forma trófica contrastam com as características morfológicas predominantes dos fungos [Matsumoto & Yoshida 1986; Ruffolo *et al.* 1989; Stringer 1996]. *Pneumocystis* não possui o esterol característico das membranas celulares de fungos (ergosterol), ao invés, contém elevadas quantidades de colesterol. O organismo sintetiza também pequenas quantidades de classes de esteróis, que são normalmente sintetizados por fungos atípicos [Stringer 1996; Kaneshiro *et al.* 1999]. A nível filogenético, o ácido ribonucleico ribossómico (rRNA, do inglês *ribosomal ribonucleic acid*), de *Pneumocystis* é codificado por apenas um gene nuclear, ao contrário de outros fungos estudados para este gene, e da maioria dos eucariotas, que possuem centenas de cópias do gene rRNA [Tang *et al.* 1998].

Estudos filogenéticos, baseados na análise do *locus* da subunidade 18S do rRNA, demonstraram que *Pneumocystis* tem mais semelhanças genéticas com fungos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* e *Cryptococcus diffuens*), do que com protozoários (*Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei* e *Acanthamoeba castellani*) [Edman *et al.* 1988; Stringer *et al.* 1989]. Genes que codificam para determinadas proteínas foram isolados de *Pneumocystis* de rato, sendo

bastante interessante observar que a sequência da proteína do factor de elongação 3 (EF3, do inglês *Elongation Factor 3*), característica de fungos, é idêntica, em 57%, à sequência EF3 de *S. cerevisiae* [Ypma-Wong *et al.* 1992]. Os genes que codificam as enzimas timidilato sintetase (TS) e dihidrofolato reductase (DHFR), ambas enzimas da via biossintética do ácido fólico, encontram-se separados em cromossomas distintos, o que contrasta com o que sucede para os protozoários parasitas típicos, que englobam estas duas actividades enzimáticas num único péptido, que por sua vez é codificado por um único gene. Foi também observado que o gene que codifica para a TS tem 65% de semelhança com o gene correspondente nos *Ascomycota* [Edman *et al.* 1989b]. Estudos moleculares, de caracterização dos genes de *Pneumocystis* que codificam para a  $\alpha$ -tubulina e a  $\beta$ -tubulina, demonstraram elevada semelhança com os seus congéneres dos fungos. O gene da  $\beta$ -tubulina apresenta um padrão característico, com uma homologia de 89 a 91% com o gene correspondente dos fungos filamentosos, e uma homologia de 79 a 82% com os genes da  $\beta$ -tubulina de leveduras e de outros protozoários [Edlind *et al.* 1992; Zhang & Stringer 1993]. Outros estudos indicam que a sequência 5S rRNA (gene que codifica para a sequência pequena do rRNA da subunidade grande ribossomal) está relacionada com a sequência correspondente, presente nos *Zigomycota* [Watanabe *et al.* 1989]. Os resultados da análise do gene da ATPase do tipo-P (ATP de adenosina trifosfato) de *Pneumocystis*, uma enzima translocadora de prótons, demonstraram que esta partilha um domínio que é exclusivo dos fungos [Stringer *et al.* 1992; Meade & Stringer 1995]. Também, outros *loci*, como são o caso do gene que codifica para a enzima multifuncional *arom*, responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos, o gene que codifica para a actina, o gene da proteína de ligação à sequência TATA e os genes que constituem o DNA mitocondrial, apresentam maior semelhança com os fungos, do que com os protozoários [Pixley *et al.* 1991; Fletcher *et al.* 1994; Banerji *et al.* 1995; Sunkin & Stringer 1995]. Por outro lado, genes relacionados com o ciclo de vida e com as respostas a situações de *stress*, estão presentes no genoma de *Pneumocystis*, sendo que estudos laboratoriais permitiram verificar que alguns destes genes demonstraram ser funcionais, quando clonados em *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* [Fox & Smulian 2000; Kottom *et al.* 2000; Smulian *et al.* 2001; Gustafson *et al.* 2001]. Em todos os casos estudados, os genes de *Pneumocystis* e as proteínas por eles codificadas são semelhantes aquelas que os fungos,



de modo geral, apresentam para as mesmas funções. Com base nestes estudos foram elaboradas árvores genealógicas, que permitiram estabelecer a classificação de *Pneumocystis* como um eucariota membro do Reino *Fungi*. *Pneumocystis* permanece como um dos mais enigmáticos organismos em estudo, com uma componente filogenética complexa e difícil de definir. A mais recente edição do dicionário de fungos segue a classificação do Género *Pneumocystis* proposta nos trabalhos de Eriksson e de Eriksson e Winka [Edman & Sogin 1994; Eriksson 1994; Eriksson & Winka 1997; Kirk *et al.* 2001; Redhead *et al.* 2006]. A classificação taxonómica de *Pneumocystis* encontra-se resumida na figura 5.

**Super Reino:** Eukaryota  
**Reino:** Fungi  
**Sub-reino:** Dikarya  
**Filo:** Ascomycota  
**Sub Filo:** Taphrinomycotina  
**Classe:** Pneumocystidomycetes  
**Subclasse:** Pneumocystidomycetidae  
**Ordem:** Pneumocystidales  
**Família:** Pneumocystidaceae  
**Género:** *Pneumocystis*

**Figura 5.** Representação esquemática abreviada da classificação taxonómica de *Pneumocystis* [Stringer *et al.* 1992; Redhead *et al.* 2006; Beck & Cushion 2009].

### 3.2. Heterogeneidade genética

Organismos de *Pneumocystis* isolados de diferentes espécies de hospedeiros, diferem entre si, quer a nível de fenótipo, quer a nível genético, sugerindo a existência de espécies distintas. A característica fenotípica, mais evidente destas divergências, é a especificidade para o hospedeiro. Estudos laboratoriais, em diversas espécies de hospedeiros, confirmaram que organismos de *Pneumocystis*, obtidos a partir de um hospedeiro específico, são incapazes de causar infecção num hospedeiro diferente, permitindo esta característica distinguir *Pneumocystis* obtido de diferentes hospedeiros.

Ao contrário, quando organismos de *Pneumocystis* obtidos de um determinado hospedeiro são transferidos para outro hospedeiro da mesma espécie, verifica-se proliferação de *Pneumocystis* e o desencadeamento de uma infecção sintomática severa [Gigliotti *et al.* 1993; Aliouat *et al.* 1994; Beard *et al.* 1999].

Com base em estudos fenotípicos, observou-se que *Pneumocystis* provenientes de hospedeiros de espécies diferentes apresentam antígenos de superfície distintos, não havendo, de um modo geral, reacção cruzada entre anticorpos anti-*Pneumocystis* isolados de um hospedeiro e antígenos de *Pneumocystis* isolados de outros hospedeiros. Porém, anticorpos anti-*Pneumocystis* que têm reacção cruzada com antígenos de *Pneumocystis* provenientes de mais do que um hospedeiro, reconhecem diferentes moléculas nos diferentes organismos de *Pneumocystis*, isto é, verifica-se especificidade destes anticorpos para regiões moleculares (epitopos) distintas entre *Pneumocystis* de hospedeiros diferentes [Kovacs *et al.* 1989b; Bauer *et al.* 1993; Linke *et al.* 1994]. A variabilidade fenotípica de *Pneumocystis* foi confirmada, recorrendo-se à técnica de separação electroforética de enzimas, seguida de avaliação da actividade enzimática *in situ*, a qual permitiu demonstrar que *Pneumocystis* isolados de diferentes hospedeiros, produziam diferentes padrões enzimáticos [Mazars *et al.* 1994; Stringer 1996].

Com base nestes conhecimentos e em estudos de caracterização genética, foi inicialmente proposto um sistema trinominal distinguindo os diferentes organismos do Género *Pneumocystis*, onde microrganismos provenientes de hospedeiros diferentes são designados como *formae specialis* de *P. carinii* [Stringer *et al.* 1997], reflectindo a origem do parasita, tal como o representado no quadro I. Após a classificação de *Pneumocystis* a nível de Reino, os estudos moleculares ao DNA, que se lhe seguiram, resultaram na constatação de que *Pneumocystis* obtidos de diferentes espécies de mamíferos são, consideravelmente, diferentes. Os estudos filogenéticos, realizados a diversas sequências de DNA de *Pneumocystis* isolados de vários hospedeiros, confirmam a existência de elevada heterogeneidade, sugerindo claramente que *Pneumocystis* obtidos de diferentes hospedeiros sejam organismos geneticamente distintos. Este grau de divergência genética, pode mesmo traduzir-se pela existência de espécies biológicas dentro do Género *Pneumocystis*.

**Quadro I.** Exemplos da nomenclatura trinomial para *Pneumocystis carinii*. A negrito encontra-se a única *formae specialis* que infecta os humanos. Cada organismo demonstra uma sequência de DNA mitocondrial própria e distinta. Organismos de *P. carinii* que infectam a mesma espécie de hospedeiro são designados por *formae specialis* (f. sp.).

Espécies de Hospedeiros	Nome Trinomial
Rato	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>carinii</i>
Rato	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>rattus</i>
<b>Humano</b>	<b><i>P. carinii</i> f. sp. <i>hominis</i></b>
Ratinho	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>muris</i>
Furão	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>mustelae</i>
Cavalo	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>equi</i>
Porco	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>suis</i>
Coelho	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>oryctolagi</i>

A divergência genética entre os organismos do Género *Pneumocystis* ficou demonstrada em estudos [Wakefield *et al.* 1990b; Pixley *et al.* 1991; Liu *et al.* 1992; Stringer *et al.* 1993b; Keely *et al.* 1994; Weinberg & Durant 1994; Mazars *et al.* 1995; Hunter & Wakefield 1996; Denis *et al.* 2000], onde se verificou que:

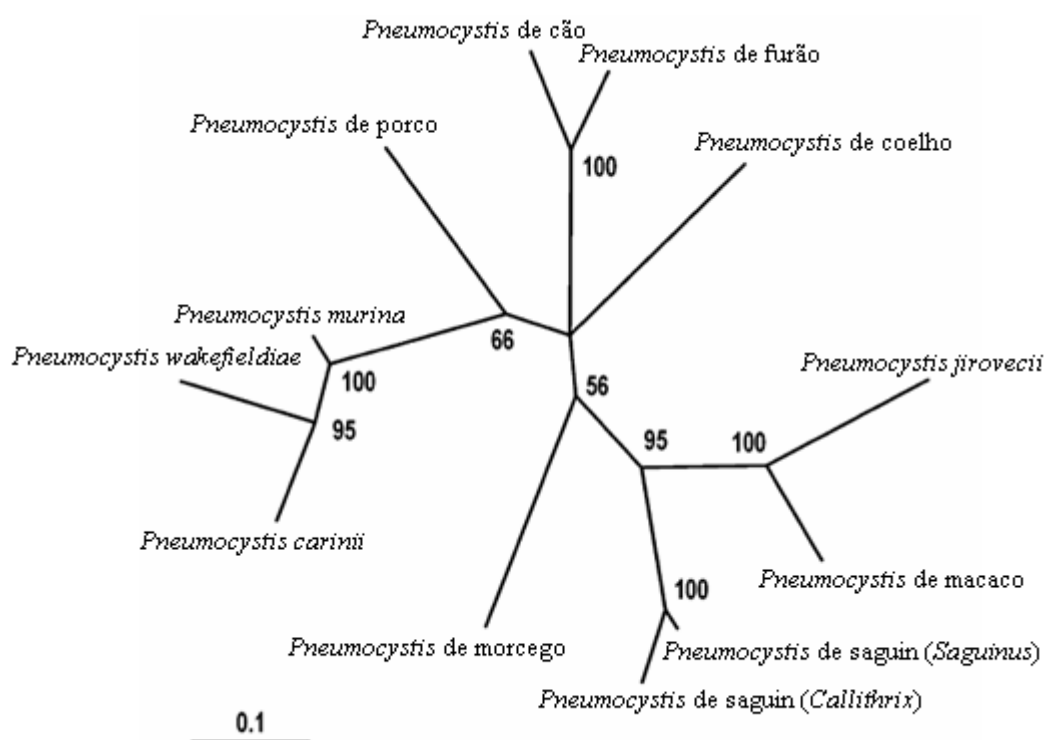
- 1) Os cromossomas de *Pneumocystis* isolados de diferentes hospedeiros migram de forma diferenciada, quando submetidos à técnica de separação electroforética em gel por campo pulsado;
- 2) Não há hibridização do DNA genómico de *Pneumocystis* isolado de rato com o DNA genómico de *Pneumocystis* isolado de humano;
- 3) Porções repetitivas de DNA, como os genes das famílias das glicoproteínas e das proteases de superfície, provenientes de *Pneumocystis* de diversos hospedeiros, são altamente divergentes;
- 4) O gene que codifica para a subunidade grande do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*) diverge entre 4 e 27% entre *Pneumocystis* isolados de nove espécies de hospedeiros;
- 5) Todos os *loci* analisados demonstram diversidade genética em *Pneumocystis* isolados de diferentes hospedeiros.

O grau de divergência genética, na sequência 18S do rRNA, verificado entre organismos de *Pneumocystis* de diferentes hospedeiros, é equivalente a 140 bases nucleotídicas (8%). Ao contrário, espécies do Género *Saccharomyces* diferem entre si, nesse *locus*, menos de 1% [Keely *et al.* 1994; Hunter & Wakefield 1996; Shah *et al.* 1996; Stringer *et al.* 2002]. Num estudo que data de 1994, uma equipe de investigadores clonou e sequenciou porções dos genes *18S rRNA*, *5.8S rRNA*, e *26S rRNA* do rRNA nuclear, e as regiões *ITS*, do inglês *internal transcribed spacer*, do operão nuclear do rRNA. Neste trabalho sobre *P. jirovecii*, as sequências nucleotídicas dos genes que codificam para as subunidades ribossomais 18S, 5.8S e 26S mostraram 90% de homologia relativamente às sequências correspondentes em *P. carinii* de rato, enquanto que as regiões *ITS* apenas apresentavam 60% de homologia relativamente às regiões equivalentes em *P. carinii* de rato [Lu *et al.* 1994].

Estes novos dados determinaram alterações na nomenclatura e, em 1999, apareceu a primeira nomenclatura binomial, proposta por J. K. Frenkel, e apoiada por J. R. Stringer, em que o organismo causador da pneumocistose humana, anteriormente designado por *P. carini* f. sp. *hominis*, é reconhecido como *Pneumocystis jirovecii*, em honra ao parasitologista checo Otto Jiroveci, o primeiro investigador a descrever a presença deste microrganismo em humanos [Frenkel 1999; Stringer 2002]. Já em 1976, Frenkel, havia percebido que existiam diferenças claras entre *Pneumocystis* provenientes de humanos e de ratos, publicando um trabalho em que surgiram as primeiras bases de sustentação para esta importante alteração na nomenclatura [Frenkel 1976]. Apesar de fortes resistências a estas alterações, em 2001, as evidências quanto à existência de múltiplas espécies e tipos deste microrganismo conduziram necessariamente à aceitação consensual do novo sistema de nomenclatura, em que *Pneumocystis* cujo hospedeiro é o homem é denominado por *P. jirovecii* [Stringer 2002; Stringer *et al.* 2002; Redhead *et al.* 2006]. A figura 6 resume a divergência filogenética evolutiva de 12 diferentes espécies de *Pneumocystis*.

Mais recentemente, durante a última década, do século passado, surgiram linhas de investigação que tendem a distinguir tipos de *P. jirovecii* geneticamente diferentes entre si. Estudos intra-específicos apontam para a existência de variações entre *Pneumocystis* isolados a partir de hospedeiros de uma mesma espécie, quer em animais, quer em humanos [Hong *et al.* 1990; Cushion *et al.* 1993; Lee *et al.* 1993; Wakefield *et*

*al.* 1994; Weinberg *et al.* 1994]. Com base nestes dados, e com a entrada do novo século, diversas regiões polimórficas do genoma de *P. jirovecii* têm sido estudadas com o intuito de clarificar o perfil epidemiológico deste microrganismo, demonstrando que a caracterização da diversidade genética pode ser útil no estudo da sua distribuição geográfica, resistência a fármacos, virulência e modos de transmissão [Miller & Wakefield 1999; Armstrong *et al.* 2000; Costa *et al.* 2003; Matos *et al.* 2003b; Beard *et al.* 2004; Crothers *et al.* 2005; Miller *et al.* 2007]. Este tipo de investigação, temática central do presente trabalho, irá ser abordada, com maior pormenor, na segunda parte do trabalho, secção 11.



**Figura 6.** Máxima probabilidade filogenética de *Pneumocystis* isolados de 12 hospedeiros diferentes. Esta inferência de relações filogenéticas (método de análise bayesiana) foi elaborada com base nas sequências nucleotídicas de dois genes de RNA ribossomal (*mtLSU rRNA* e *mtSSU rRNA*) concatenados. Junto aos nós de divergência encontram-se as percentagens correspondentes às probabilidades inferidas pela análise filogenética. As bifurcações com valores inferiores a 50% não foram consideradas. A barra representada indica uma escala de 0.1 substituições por par de bases (adaptado de Aliouat-Denis *et al.* 2008).

## 4. Metabolismo, bioquímica e características de superfície

### 4.1. Introdução ao metabolismo geral de *Pneumocystis*

Embora do ponto de vista clínico, *Pneumocystis* e a pneumocistose estejam bem caracterizados, a nível bioquímico e metabólico, pouco se sabe acerca do microrganismo, do seu *modus operandi* para obtenção de energia e de que forma a sua maquinaria celular está organizada. Pensa-se que *Pneumocystis* é um organismo saprófita, pois sintetiza e excreta enzimas extracelulares específicas que actuam, especialmente, sobre macromoléculas, originando moléculas de tamanho e peso molecular mais reduzidos. Devido às pequenas dimensões, estas moléculas podem ser transportadas através da membrana celular e desta forma introduzidas na célula [Vavra & Kucera 1970; Yoshida 1989]. A confirmação da actividade da fosfatase ácida à superfície de trofozoítos e de quistos, bem como, a presença de vacúolos autofágicos e de lisossomas primários, são factos que suportam esta teoria [Itatani & Marshall 1988; Palluault *et al.* 1992]. Em todo o caso, não é conhecida ao certo, qual a fonte de nutrientes do microrganismo, quando habita o alvéolo pulmonar. Porém, foi colocada a hipótese de os trofozoítos, ao aderirem às células hospedeiras, terem a capacidade de induzir a activação do sistema vesicular de transporte da membrana plasmática dos pneumócitos, tendo este processo como consequência o fornecimento de nutrientes ao parasita, a partir dos capilares alveolares [Nielsen & Settnes 1991].

Ambientes com concentrações de O<sub>2</sub> superiores a 50% são tóxicos para *Pneumocystis*. O microrganismo consome baixos níveis de O<sub>2</sub>, mantendo-se viável em condições de hipoxia. Com excepção da superóxido dismutase, os níveis de actividade das enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase e a catalase, aparentam ser baixos. *Pneumocystis* tem, muito provavelmente, um metabolismo aeróbio [Pesanti 1984; Itatani & Marshall 1988; Yoshida 1989]. A presença de mitocôndrias sugere as capacidades metabólicas aeróbias do microrganismo. A glucose é metabolizada pela via clássica da glicólise, muito provavelmente, pela via Embden-Meyerhof, sequência metabólica pela qual a glicose é oxidada, originando ácido pirúvico, ATP e nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*). Porém, existem evidências de várias enzimas integrantes da via das pentoses-fosfato, via alternativa para a oxidação da glicose, durante a qual é produzida

nicotinamida adenina dinucleótido hidrofosfato (NADPH, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide hydro phosphate*) e ribose-5-fosfato, molécula essencial para a síntese de ácidos nucleicos e de coenzimas, como ATP e  $\text{NAD}^+$ . Estudos indicam, também, a existência de enzimas do ciclo de Krebs, via metabólica, que ocorre na matriz da mitocôndria, e que utiliza o piruvato, obtido durante a glicólise, transformando-o em acetil coenzima A (acetil CoA). A acetil CoA reage com oxaloacetato, formando citrato, que é processado sucessivamente até à obtenção de oxaloacetato. Este processo oxidativo permite a transferência de electrões que reduzem as moléculas de  $\text{NAD}^+$  em NADH. No final, o oxaloacetato é regenerado, repetindo-se o ciclo. A presença de componentes da cadeia transportadora de electrões, localizada na membrana interna das mitocôndrias, confirma a possibilidade de ocorrência de fosforilação oxidativa, que consiste na fosforilação de adenosina difosfato (ADP) em ATP, através de uma sucessão de reacções de oxidação-redução [Pesanti & Cox 1981; Mazer *et al.* 1987; Kaneshiro & Sleight 1994; Sul & Kaneshiro 1997; Kaneshiro 1998]. Outros estudos indicam que o metabolismo das poliaminas, moléculas implicadas na replicação de DNA, parece ser fundamental para a proliferação e diferenciação celulares de *Pneumocystis* [Lipschik *et al.* 1991; Kaneshiro & Sleight 1994].

#### 4.2. Hidratos de carbono

A glucose é o principal polissacárido da parede celular, encontrando-se, também, presentes a galactose e a manose, em igual percentagem e, em menor percentagem, a ribose, a N-acetil-D-glucosamina e o ácido siálico. Estes açúcares desempenham, provavelmente, funções estruturais ligadas à permeabilidade da parede celular dos quistos e à adesão e interacção parasita-hospedeiro [Pesanti & Cox 1981; De Stefano *et al.* 1990a; Garner *et al.* 1991]. O  $\beta$ -1,3-glucano, molécula integrante da parede celular dos quistos de *Pneumocystis*, parece ser responsável pela solidez e rigidez desta estrutura. Por seu lado, a quitina foi detectada nas várias formas morfológicas do ciclo de vida do organismo, parecendo conferir rigidez e resistência à parede celular [Matsumoto *et al.* 1989; Walker *et al.* 1990; Garner *et al.* 1991].

### 4.3. Lípidos

O citoplasma dos trofozoítos demonstra grandes reservas lipídicas, ao contrário dos corpos intraquísticos, onde estas reservas são praticamente inexistentes [Yoshida 1989]. Estudos efectuados em *Pneumocystis*, isolado de pulmão de rato, demonstraram que o colesterol é o esteroide mais abundante [Kaneshiro & Sleight 1994; Zhao *et al.* 2003]. Estudos *in vitro* mostraram que quando células de *Pneumocystis* estabelecem contacto com células epiteliais alveolares dos hospedeiros, conseguem interiorizar, nas suas reservas, lípidos provenientes quer, do meio circundante, quer das próprias células epiteliais [De Stefano *et al.* 1990b; Paulsrud & Queener 1994; Kaneshiro & Sleight 1994]. Por outro lado, têm, também, a capacidade de sintetizar lípidos específicos, em pequenas quantidades, de forma a garantir as suas funções e necessidades vitais. Quanto à composição da parede quística, é interessante verificar que esta é constituída por cerca de 50% de hidratos de carbono e por cerca de 50% de lípidos, sugerindo, este facto, que estes têm importância fulcral na estrutura da célula de *P. jirovecii* [Campbell, Jr. 1972; Stringer *et al.* 1992].

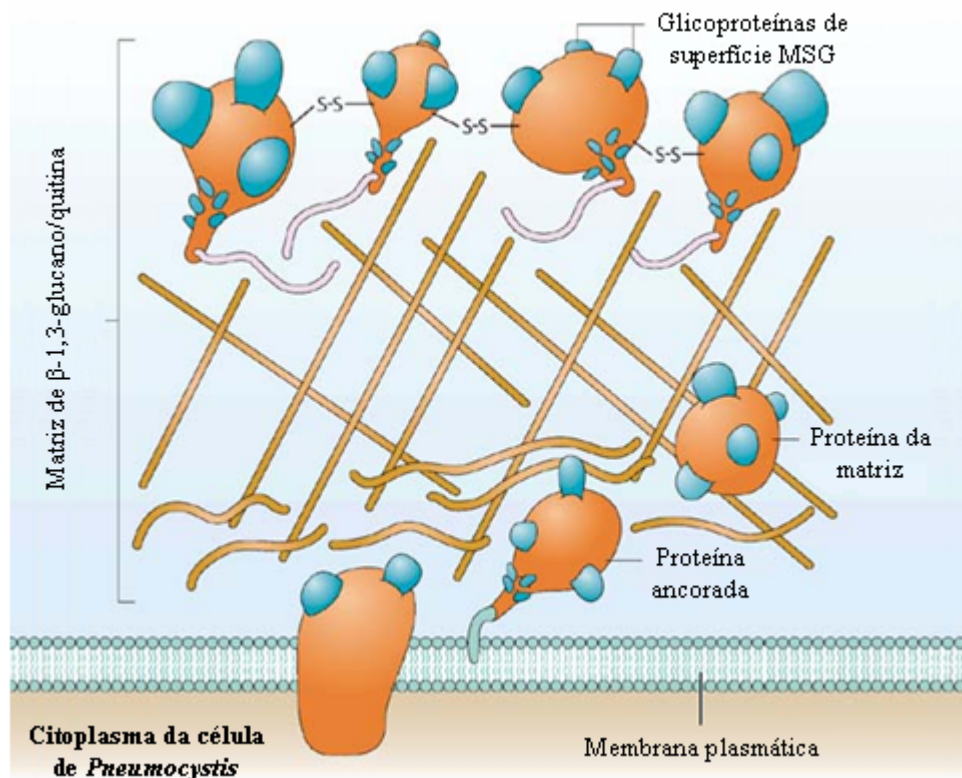
### 4.4. Proteínas

A detecção de uma ATPase transmembranar, que funciona como uma bomba de prótons, conduziu à teoria de que esta enzima é responsável pela manutenção de um gradiente de prótons ( $H^+$ ) que permite um mecanismo de transporte membranar de nutrientes, como aminoácidos e glucose, para o interior da célula de *Pneumocystis* [Pesanti & Cox 1981; Meade & Stringer 1991]. A identificação ultraestrutural de microtúbulos, sugere a presença de monómeros de tubulina, cuja existência foi confirmada por estudos moleculares que identificaram os genes que codificam, para a  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina [Edlind *et al.* 1992; Zhang & Stringer 1993]. Enzimas com funções fundamentais, tais como a *arom*, a timidilato sintetase (TS) e a tiorredoxina reductase (TRR), foram também identificadas e caracterizadas com recurso a métodos moleculares [Edman *et al.* 1989b; Banerji *et al.* 1995; Kutty *et al.* 2003]. O microrganismo é incapaz de absorver folatos do meio externo, possuindo uma bateria de enzimas que permitem a síntese de folatos *de novo*, como é o caso da dihidropteroato sintetase (DHPS) e da dihidrofolato reductase (DHFR) [Allegra *et al.* 1987; Hong *et al.* 1995].



#### 4.5. Propriedades antigénicas de superfície

A parede celular de *P. jirovecii* é composta por uma complexa matriz de hidratos de carbono e proteínas estruturais que, se pensa, estarem em constante fluxo, durante a fase de replicação e os estádios de desenvolvimento do microrganismo (figura 7). As principais proteínas antigénicas de superfície de *P. jirovecii*, encontradas, quer nos trofozoítos, quer nos quistos, são as MSG, que representam a grande maioria dos antígenos da superfície das células deste organismo, e que evidenciam estarem envolvidas na interacção parasita-hospedeiro [Linke *et al.* 1989; Kutty *et al.* 2001; Stringer 2007; Esteves *et al.* 2009].



**Figura 7.** Representação esquemática da composição da parede celular de *P. jirovecii*. Na superfície celular, pode-se observar a abundância dos antígenos típicos de *P. jirovecii*, as glicoproteínas de superfície MSG. A matriz de  $\beta$ -1,3-glucano e quitina confere estabilidade estrutural e rigidez à parede celular (adaptado de Thomas, Jr. & Limper 2007).

O complexo proteico encontra-se fortemente glicosidado com hidratos de carbono ricos em manose, apresentando uma massa molecular de 95-120 kDa. O genoma de *P. jirovecii* possui, aproximadamente, 100 genes que codificam para diferentes MSGs, no entanto, apenas uma isoforma de MSG é expressa, num dado momento da infecção. O microrganismo demonstra uma interessante capacidade para evadir-se ao sistema imune do hospedeiro, pois, através de um mecanismo genético, consegue alterar a isoforma de MSG que é expressa à superfície da célula. Os estímulos que conduzem a este fenómeno não foram, até ao momento, identificados. As isoformas das MSGs expressas em *Pneumocystis* isolados de diferentes hospedeiros têm características antigénicas específicas e são distintas para os vários géneros de *Pneumocystis*. A abundância destas glicoproteínas, localizadas à superfície de *P. jirovecii*, permite a produção de anticorpos monoclonais anti-MSG altamente específicos, demonstrando a forte capacidade antigénica destas moléculas. [Kovacs *et al.* 1989b; Gigliotti 1992; Nakamura & Wada 1998; Thomas, Jr. & Limper 2007; Lu & Lee 2008].

Pensa-se que outra enzima, a protease KEX1, do inglês *kexin-like serine protease*, possa desempenhar importantes funções no processamento de outras proteínas, em especial das proteínas de superfície, como as MSG, estando, por isso, envolvida nos processos moleculares que conduzem à invasão das células hospedeiras [Lugli *et al.* 1997; Lee *et al.* 2000; Lu & Lee 2008; Esteves *et al.* 2009].

## 5. Epidemiologia da infecção por *Pneumocystis jirovecii*

### 5.1. Prevalência

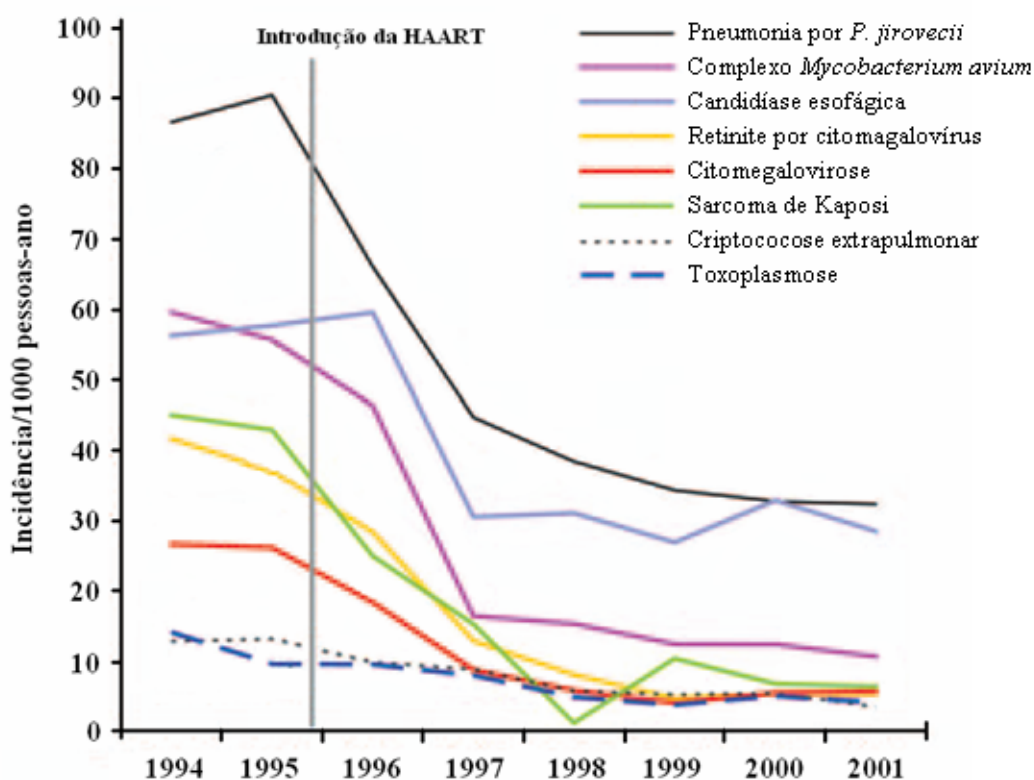
#### 5.1.1. Preponderância da pneumocistose nos países ocidentais industrializados

A acompanhar o surgimento da pandemia de sida, no início dos anos 80, do século passado, deu-se uma alteração significativa da incidência de pneumocistose, nos países ocidentais industrializados, passando de uma infecção rara, para uma pneumonia comum [Lundgren *et al.* 1995; Stringer 2002; Morris *et al.* 2004].

Com o aumento significativo de doentes com PPc, esta tornou-se uma das doenças definidoras de sida. Estimava-se que cerca de 75% dos doentes com sida desenvolveriam pneumocistose, pelo menos, uma vez, no decorrer da sua infecção. A PPc liderava a lista das causas de morte nos doentes com esta síndrome (20-25%), sendo responsável por dois terços das infecções definidoras de sida. De resto, a ocorrência de PPc em grupos específicos de pessoas (ex. homossexuais e utilizadores de drogas intravenosas) foi um dos primeiros indicadores da epidemia por VIH [Hay *et al.* 1988; Dei-Cas 2000; Barry & Johnson 2001].

Um estudo europeu, que decorreu entre 1980 e 1989, demonstrou que a incidência da PPc no momento do diagnóstico da sida, no Norte da Europa, era de 50%, no Centro de 36% e no Sul de 30%, variando claramente conforme a região [Lundgren *et al.* 1995]. O primeiro grande revés na incidência de PPc, deu-se com a introdução da profilaxia anti-*Pneumocystis*, iniciada no ano de 1989. As percentagens de casos de co-infecção VIH/*P. jirovecii*, nos E.U.A., diminuíram de 53% em 1989, para 42% em 1992 [Fischl *et al.* 1988; Morris *et al.* 2004]. Num outro estudo europeu, que englobou nove países, incluindo Portugal, verificou-se que o risco de PPc no momento do diagnóstico de sida, diminuiu de 37,7% em 1988 para 30,5% em 1992 [Delmas *et al.* 1995]. Com a introdução da HAART, em 1996, verificou-se uma redução clara de doenças oportunistas, frequentes nos doentes com sida, entre as quais, a PPc. Estudos longitudinais confirmam um declínio acentuado da PPc, nos E.U.A. e na Europa Ocidental, a partir do final da década de 80, e, nos primeiros anos da década de 90, do século passado, atribuindo-se este facto ao uso generalizado da quimioprofilaxia anti-*Pneumocystis*, à qual se juntou mais tarde a HAART para o VIH (figura 8) [Palella, Jr.

*et al.* 1998; Mocroft *et al.* 2000]. Calcula-se que a frequência de PPc, nos adultos nos E.U.A., tenha sofrido um decréscimo de 3,4% ao ano, entre 1992 e 1995, e de 21,5% ao ano, entre 1996 e 1998 [Kaplan *et al.* 2000]. Na Europa, o estudo EuroSIDA, demonstrou que a incidência de PPc decresceu de 4.9 casos por 100 pessoas/ano em Março de 1995, para 0.3 casos por 100 pessoas/ano em Março de 1998, observando-se, tal como nos E.U.A., alterações significativas na incidência desta infecção oportunista, após a introdução da HAART [Weverling *et al.* 1999; Mocroft *et al.* 2000].



**Figura 8.** Representação gráfica dos resultados de um estudo epidemiológico, intitulado ASD, do inglês *Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease*, efectuado às taxas de infecções oportunistas por 1000 pessoas-ano, realizado pelo centro de controlo e prevenção de doenças dos E.U.A., CDC do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*. A informação reporta-se aos casos de infecções oportunistas que ocorreram na população com sida durante os anos de 1994 e 2001, nos E.U.A. No gráfico, é visível, o declínio dos casos de infecções oportunistas naquela população, em especial da pneumocistose, claramente marcado pela introdução da HAART combinada com a profilaxia anti-*P. jirovecii* (adaptado de Morris *et al.* 2004).

A pneumocistose permanece como uma causa significativa de morbilidade e mortalidade na era da HAART. Nos países industrializados, em especial nos E.U.A. e na Europa, a infecção por *P. jirovecii* é, ainda, a infecção oportunista mais comum em doentes com sida, ocorrendo predominantemente em doentes que, não recebem, ou não recorrem a cuidados médicos (44%), a maioria, desconhecendo que está infectada por VIH e, também, em doentes que, apesar do acesso aos cuidados médicos, não cumprem os programas de prevenção da doença (41%) [Roux *et al.* 1998; Barry & Johnson 2001; Morris *et al.* 2004; Walzer *et al.* 2008]. Do ponto de vista epidemiológico, constata-se que perto de 80% dos adultos apresentam anticorpos anti-*P. jirovecii* que indicam um contacto com o microrganismo. Pensa-se que a infecção por *P. jirovecii* é adquirida durante a infância, pois evidências serológicas sugerem que a maioria (75%) das crianças saudáveis, nos E.U.A e na Europa, com idades compreendidas entre os três e os quatro anos, já foram expostas a este agente infeccioso [Pifer *et al.* 1978; Peglow *et al.* 1990; Hughes 1998].

### **5.1.2. Preponderância da pneumocistose nos países em vias de desenvolvimento**

A infecção por *P. jirovecii* não se encontra confinada aos países desenvolvidos. Estudos indicam que no Quênia, Republica Democrática do Congo (antigo Zaire), Africa do Sul e México, são detectadas elevadas taxas de seroprevalência, em adultos, idênticas às observadas nos E.U.A. e na Europa [Smulian *et al.* 1993]. Em contraste com as melhorias significativas dos cuidados de saúde nos seropositivos para VIH nos países industrializados, a sida continua como a mais devastadora pandemia noutras regiões do globo, mais especificamente nos países em vias de desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 33 milhões de pessoas estejam infectadas por VIH, e que 90 a 95% destes infectados vivam em países em desenvolvimento. A dificuldade em implementar cuidados médicos adequados, que comportem a HAART e a profilaxia anti-*P. jirovecii*, nestas regiões é evidente. Associada à sida, a PPc continua a ser uma infecção frequente nestes países [Fisk *et al.* 2003; Paixão 2008; Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 2008].

A prevalência da PPc entre doentes seropositivos para VIH atinge os 40% na Tailândia, 55% no Brasil e situa-se entre os 24 e 29% em países da América Central [Pitchenik *et al.* 1983; Mohar *et al.* 1992; Weinberg & Duarte 1993; Wannamethee *et*

*al.* 1998]. Porém, em África, a frequência de infecção por *P. jirovecii*, nos adultos seropositivos para VIH, é normalmente baixa (entre 5 e 11%). Apenas dois estudos, realizados em doentes do Zimbabué e do Uganda, apresentam uma frequência de 33 e 39%, respectivamente [Malin *et al.* 1995; Worodria *et al.* 2003; Morris *et al.* 2004]. A constante detecção de baixas frequências de PPc em África, pode ter origem em diversos factores que conduzem a baixas estimativas dos casos da infecção, como os limitados recursos financeiros e técnicos para o diagnóstico e a carência de pessoal habilitado e experiente para efectuar o diagnóstico laboratorial de forma correcta. As elevadas taxas de infecção por tuberculose e por bactérias que provocam pneumonia, verificadas nos adultos africanos seropositivos para VIH, resultam, grande parte das vezes, na morte destes doentes, mesmo antes destes atingirem um patamar de imunodeficiência (concentração de células TCD4<sup>+</sup> inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>) no qual é comum desenvolver-se a pneumocistose [Morris *et al.* 2004]. Em contraste com o que acontece na população africana adulta, a PPc parece ser mais comum entre as crianças infectadas por VIH. Diversos estudos indicam frequências que podem ir desde 14 até 49% [Lucas *et al.* 1996; Ruffini & Madhi 2002].

### 5.1.3. Preponderância da pneumocistose nos doentes seronegativos para VIH

Actualmente, a pneumocistose continua a ser uma importante infecção oportunista entre imunocomprometidos, seronegativos para VIH. Estima-se que *P. jirovecii* seja a causa de pneumonia em 10 a 40% destes doentes, sendo que a mortalidade nos casos de PPc em imunocomprometidos, seronegativos para VIH se situa entre os 40 e os 50% [Yale & Limper 1996; Dei-Cas 2000].

Neste contexto, torna-se importante referir os principais grupos de doentes de risco, seronegativos para VIH, que podem desenvolver a doença [Varthalitis *et al.* 1993; Cardenal *et al.* 2001; Matos *et al.* 2003a; Cushion 2004; Peterson & Cushion 2005; Matos *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2006]:

- 1) Doentes oncológicos submetidos a quimioterapia e/ou radioterapia;
- 2) Receptores de órgãos transplantados sujeitos a imunossupressão iatrogénica induzida;
- 3) Indivíduos com doenças reumáticas submetidos a corticoterapia;
- 4) Indivíduos com doenças auto-imunes a receberem terapia imunossupressiva;

- 5) Indivíduos com imunodepressão congénita;
- 6) Crianças com imunodeficiências primárias;
- 7) Crianças prematuras ou mal nutridas;
- 8) Doentes com lesões pulmonares causadas por doenças pulmonares crónicas.

## 5.2. Transmissão e reservatórios naturais

O conhecimento relativo ao ciclo de vida de *Pneumocystis* permanece incompleto, limitando a compreensão acerca dos modos de transmissão e da identificação de potenciais agentes transmissores e de reservas da infecção. Formas do ciclo de vida de *Pneumocystis* têm vindo a ser caracterizadas nos alvéolos pulmonares dos hospedeiros, sendo que o ciclo de vida postulado para este microrganismo, apenas apresenta formas típicas identificadas nestes tecidos [Campbell, Jr. 1972; Matsumoto & Yoshida 1986; Yoshikawa & Yoshida 1989].

A evolução de *Pneumocystis* fora do hospedeiro mantém-se desconhecida, como tal, até à data, não está estabelecida qual a forma infectante do microrganismo. Alguns autores sugerem que as formas quísticas são compatíveis com estruturas de dormência do parasita, estando adaptados para a transmissão entre hospedeiros. Pensa-se que a via aérea é o modo preferencial de transmissão do microrganismo. Estudos efectuados em modelo animal demonstraram que roedores e primatas imunossuprimidos podem ser infectados por *Pneumocystis*, através do aparelho respiratório, por inalação de material infeccioso, ficando provada a potencialidade da transmissão de *Pneumocystis* por via aérea. Um outro estudo demonstrou que um inoculo de 10 microrganismos é capaz de causar infecção em ratos imunossuprimidos, sugerindo que o número de organismos a inalar, necessários para provocar infecção, pode ser relativamente reduzido, dependendo, muito possivelmente, do grau de imunossupressão do hospedeiro [Vavra & Kucera 1970; Hughes 1982; Soulez *et al.* 1991; Dei-Cas *et al.* 1998; Cushion *et al.* 1999].

O registo de pequenos surtos epidémicos de PPc em doentes internados em hospitais e em co-habitantes de lares, bem como, estudos efectuados à qualidade do ar de hospitais, que demonstram a presença de DNA de *P. jirovecii* em amostras de ar recolhidas em quartos e enfermarias onde se encontravam internados doentes com pneumocistose, põem em evidência que a transmissão por via aérea é um modo de

propagação bastante viável para a pneumocistose [Singer *et al.* 1975; Fenelon *et al.* 1985; Goesch *et al.* 1990; Bartlett *et al.* 1996; Olsson *et al.* 1996b]. Ao investigarem as características genéticas do DNA isolado a partir do ar dos quartos dos doentes com PPc, os autores desses estudos, depararam-se com o facto de que os genótipos dessas amostras eram coincidentes com os genótipos isolados a partir das amostras biológicas recolhidas dos doentes, sugerindo a via aérea como um potencial mecanismo de transmissão de *P. jirovecii* e um importante factor a ter em conta, especialmente nos locais onde podem co-habitar doentes imunocomprometidos e doentes com PPc [Bartlett *et al.* 1996; Olsson *et al.* 1996b].

O risco de transmissão nosocomial é também evidente, pois, estudos serológicos indicam um aumento do título de anticorpos séricos anti-*P. jirovecii* no pessoal hospitalar, que mantém contacto com doentes com co-infecção VIH/*P. jirovecii* [Leigh *et al.* 1993; Lundgren *et al.* 1997]. A transmissão entre doentes com PPc e outros doentes imunocomprometidos e, entre doentes com PPc e pessoal hospitalar, foi confirmada por estudos moleculares que, devido à sua elevada sensibilidade, para além de permitirem caracterizar as amostras dos doentes imunocomprometidos, permitiram também detectar e genotipar *P. jirovecii* nas amostras do pessoal hospitalar, imunocompetente. Estes trabalhos de investigação indicam que o pessoal médico pode ser portador de *P. jirovecii* e representar uma potencial fonte de infecção para os doentes imunocomprometidos [Vargas *et al.* 2000; Miller *et al.* 2001; Rabodonirina *et al.* 2004; Hocker *et al.* 2005].

Estudos moleculares, baseados em técnicas sensíveis, permitiram a detecção de *P. jirovecii* em amostras biológicas de pessoas hospitalizadas, seronegativas para VIH, sem imunossupressão severa. Foi também demonstrado experimentalmente, utilizando o modelo animal, que em determinadas condições, o microrganismo tem a capacidade de se multiplicar, transitoriamente, nos pulmões de hospedeiros imunocompetentes. Este grupo de hospedeiros representa, por um lado, uma importante fonte de transmissão por via aérea para os imunocomprometidos susceptíveis, e por outro, uma importante reserva de *Pneumocystis* [Montes-Cano *et al.* 2004; Chabe *et al.* 2004; Peterson & Cushion 2005; Matos *et al.* 2006]. Outros estudos, realizados em espécimes pulmonares humanos, providenciaram informação adicional que sugere a transmissão deste agente infeccioso por via aérea, a partir de uma fonte infecciosa exógena comum, ou então, a



transmissão a partir de hospedeiros colonizados, ou portadores assintomáticos (seropositivos ou seronegativos para VIH) para hospedeiros susceptíveis [Miller *et al.* 2002; Rivero *et al.* 2008].

A transmissão vertical de *P. jirovecii*, apesar de controversa, foi sugerida para os humanos [Mortier *et al.* 1995; Hughes 1995a]. A ocorrência deste modo de transmissão parece variar conforme a espécie do mamífero hospedeiro. A transmissão transplacentária foi demonstrada em coelhos, no entanto, em estudos efectuados noutros roedores, parece ser um fenómeno raro [Cere *et al.* 1997; Hong *et al.* 1999; Sanchez *et al.* 2007]. Recentemente, um estudo molecular para avaliação da transmissão vertical de *P. jirovecii* em humanos, foi efectuado em placentas e tecido de pulmão de fetos abortados por mulheres imunocomprometidas, permitindo concluir que, efectivamente, a transmissão de *P. jirovecii* pode ocorrer da mãe para o feto, através da via transplacentária [Montes-Cano *et al.* 2009].

*Pneumocystis* que infecta um determinado hospedeiro, apenas é capaz de causar doença nesse mesmo hospedeiro. A infecção por *Pneumocystis* apresenta especificidade entre a espécie do parasita e o respectivo hospedeiro, isto é, o microrganismo que infecta os humanos, *P. jirovecii*, é diferente de *Pneumocystis* que infectam outros mamíferos, não podendo a infecção ser adquirida a partir de um reservatório animal [Gigliotti *et al.* 1993; Stringer & Walzer 1996; Wakefield 2002]. Existem inúmeros trabalhos de investigação que indicam a transmissão directa de *P. jirovecii* de pessoa-a-pessoa. A evidência de transmissão de *P. jirovecii* entre imunocompetentes e imunocomprometidos, a infecção por *P. jirovecii* em recém-nascidos e crianças, e a possível associação entre a infecção por *P. jirovecii* e a síndrome de morte súbita infantil, apoiam, de certa forma, a teoria de transmissão pessoa-a-pessoa [Pifer *et al.* 1978; Vargas *et al.* 1999; Vargas *et al.* 2000; Vargas *et al.* 2001].

A existência de reservatórios ambientais de *P. jirovecii* não está colocada de parte, aceitando-se que este microrganismo se encontre distribuído pelo ambiente. O DNA de *Pneumocystis*, isolado do Homem e do rato, foi, também, detectado em amostras ambientais de ar e de água, sem que, no entanto, tenham sido identificadas formas microscópicas típicas deste microrganismo. Alguns autores sugerem que o solo também possa ser um reservatório para *Pneumocystis*, funcionando como uma fonte de contaminação e de transmissão para os hospedeiros [Wakefield 1996; Casanova-Cardiel

& Leibowitz 1997; Bartlett *et al.* 1997; Lundgren & Wakefield 1998; Dei-Cas 2000; Navin *et al.* 2000].

### 5.3. Latência *versus* reinfecção

Durante décadas pensou-se que os casos de PPc eram resultado da reactivação de infecção latente no alvéolo pulmonar. O modelo etiológico da PPc em adultos sugeria que todas as pessoas eram infectadas durante a infância, e que, os episódios de PPc resultavam da reactivação de uma infecção latente. Devido à elevada seroprevalência de anticorpos anti-*P. jirovecii* em crianças até aos dois anos de idade, presumia-se que os organismos latentes eram adquiridos pelos hospedeiros ainda em tenra idade [Pifer *et al.* 1978; Peglow *et al.* 1990; Hughes 1998].

Uma vez adquirido, *P. jirovecii* pode manter-se no pulmão do hospedeiro imunocompetente sem causar sintomatologia, pois o sistema imunitário controla com sucesso a infecção clínica, mas não elimina o microrganismo [Nevez *et al.* 1997; Sing *et al.* 1999; Chabe *et al.* 2004; Matos *et al.* 2006]. Apenas em situação de imunossupressão, a infecção latente reactiva-se e causa doença. A PPc ocorre com elevada prevalência em subgrupos específicos da população, como por exemplo, em doentes com sida. A hipótese de latência, foi considerada válida, pois, na altura, não havia evidência de que poderiam existir outros subgrupos da população que funcionassem como portadores de *P. jirovecii*. Inicialmente, a descoberta da capacidade de variação antigénica de superfície de *P. jirovecii*, transmitiu a ideia de que o microrganismo teria co-evoluído de forma a habitar os alvéolos pulmonares do hospedeiro durante um longo período de tempo. Também a especificidade para o hospedeiro sugere co-evolução do parasita e do hospedeiro, implicando um longo período de contacto entre o microrganismo infectante e o hospedeiro [Cushion 1994; Stringer & Walzer 1996; Wakefield 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008].

Resultados de diversos estudos suportam a ideia de que *P. jirovecii* pode ser adquirido *de novo*, contrariando a infecção latente como principal mecanismo de infecção. Informação recolhida em estudos epidemiológicos em humanos e no modelo animal, demonstram que o hospedeiro consegue eliminar *Pneumocystis* do seu organismo, refutando a hipótese de que o parasita permanece no pulmão do hospedeiro por um período de tempo indeterminado [Chen *et al.* 1993; Vargas *et al.* 1995].

Recentemente, em alguns estudos onde foram aplicadas técnicas moleculares muito sensíveis e específicas, não foi possível detectar *P. jirovecii* em imunocompetentes saudáveis. Estes estudos foram realizados em amostras do aparelho respiratório, tecido pulmonar e secreções pulmonares, e em amostras *post-mortem* de pulmões, usando técnicas imuno-histoquímicas e de amplificação de DNA [Peters *et al.* 1992; Oz & Hughes 2000].

A distribuição geográfica cosmopolita e o aparecimento de pequenos surtos pontuais de pneumocistose, em grupos específicos e restritos de hospedeiros imunocomprometidos, indicam que, provavelmente, se está perante fenómenos de reinfecção, com novos microrganismos, e não de reactivação de *P. jirovecii* adquirido na infância [Singer *et al.* 1975; Chusid & Heyrman 1978; Jacobs *et al.* 1991; Cushion 1994; Stringer & Walzer 1996]. A reinfecção por *P. jirovecii*, por exposição a uma fonte de contaminação exógena, é um fenómeno comum. A análise molecular ao DNA de *P. jirovecii*, em doentes seropositivos para VIH com episódios recorrentes de PPc, demonstrou, que em alguns destes doentes, os genótipos identificados no segundo e subsequentes episódios eram diferentes dos genótipos detectados durante o primeiro episódio, sugerindo reinfecção por diferentes microrganismos. A constatação da alteração de genótipos entre os episódios de pneumocistose reforça a ideia de que a infecção pode ser adquirida *de novo*, em vez de ser resultado da reactivação de uma infecção adquirida anteriormente [Tsolaki *et al.* 1996; Keely & Stringer 1997; Latouche *et al.* 1997b]. Estudos populacionais moleculares demonstraram que os padrões de distribuição das frequências alélicas de isolados de *P. jirovecii* estão mais fortemente associadas com o local onde o diagnóstico é feito, do que com o local de nascimento dos hospedeiros infectados. A relação da variação geográfica de distribuição de genótipos com o local de residência dos hospedeiros, indica um contacto recente entre o agente patogénico e os hospedeiros, antes destes desenvolverem PPc. [Dohn *et al.* 2000; Beard *et al.* 2000].

A clarificação da transmissão da infecção é fundamental para que sejam reconhecidos todos os riscos para os doentes imunocomprometidos. Se a infecção for latente, não haverá necessidade de proteger os doentes adultos, de alto risco, e os estudos de transmissão da infecção devem restringir-se às crianças. Todavia, se a PPc é causada por uma fonte exógena, por infecção *de novo* de *P. jirovecii*, será apropriado

desenvolver esforços para identificar as fontes de contágio, evitando que os doentes de alto risco sejam expostos às mesmas [Stringer & Walzer 1996; Barry & Johnson 2001].

## 6. Apresentação clínica da pneumocistose

### 6.1. Introdução à infecção por *Pneumocystis jirovecii*

A infecção por *P. jirovecii* é considerada como oportunista, comum em doentes com sida e outros imunocomprometidos, tendo ganho especial importância no início da década de 80, do século passado. Antes de 1985, a sobrevivência de um doente com um episódio de PPc era de 50%. Devido à contínua degradação do estado de saúde dos doentes com sida, 60% dos que recuperavam de um caso de PPc, voltavam a padecer da doença. A severidade da infecção pulmonar provocada pelo microrganismo fazia com que a maioria dos doentes necessitasse de suporte de ventilação mecânica em unidades de cuidados intensivos. Em alguns locais, a taxa de mortalidade por PPc, nos doentes com suporte de ventilação ultrapassava os 80% [Kovacs *et al.* 1984; Wachter *et al.* 1986; Dohn *et al.* 1992]. Grande parte da investigação efectuada na área da sida focou-se na problemática da pneumocistose, a infecção oportunista que mais afectava os doentes seropositivos para VIH. Estes esforços conduziram a metodologias de diagnóstico, de profilaxia e de tratamento mais eficazes.

Com os regimes profiláticos e a implementação de terapias antiretrovirais, os doentes passaram a viver mais tempo e com uma melhor qualidade de vida [Moe & Hardy 1994]. Permanecem por esclarecer as razões pelas quais alguns doentes sofrem de graus moderados de PPc, com resposta favorável aos fármacos anti-*P. jirovecii*, enquanto outros sofrem de PPc severa, que pode ser fatal, apesar da terapia. A ocorrência de casos de insucesso terapêutico indica que determinados isolados de *P. jirovecii* podem ser mais virulentos ou resistentes. Todavia, factores relacionados com o hospedeiro também têm sido largamente estudados e associados à morbilidade e mortalidade causadas pela pneumocistose [Barry & Johnson 2001; Walzer *et al.* 2008]. Na ausência de um sistema reprodutível e viável de cultura de *P. jirovecii*, as respostas a estas questões têm vindo a ser investigadas através de estudos clínicos e epidemiológicos.

## 6.2. Infecção pulmonar por *Pneumocystis jirovecii*

Dadas as características de *P. jirovecii* e a sua afinidade para parasitar os pneumócitos do tipo I dos alvéolos pulmonares, as manifestações pulmonares são as mais frequentes numa infecção causada por este microrganismo. No hospedeiro com sistema imunitário intacto, o controlo da infecção é a regra, não havendo consequências clínicas, mas quando o sistema imunitário se encontra fragilizado, aumenta, consideravelmente, a probabilidade deste microrganismo se tornar activo e se desenvolver. Após estabelecer a infecção no pulmão de um doente imunocomprometido, o parasita destrói as células hospedeiras promovendo o consequente processo inflamatório, que provoca hipoxemia e que pode culminar na morte do hospedeiro, por insuficiência respiratória grave [Yoneda & Walzer 1983; Moe & Hardy 1994; Thomas, Jr. & Limper 1998; Aliouat-Denis *et al.* 2008].

Os sintomas típicos de um doente com PPc são a febre, entre 38°C e 40°C, em mais de 80% dos doentes, a tosse não produtiva, em mais de 50% dos doentes, podendo ser acompanhada de expectoração em 20 a 30% dos casos, e a dispneia de agravamento progressivo, em mais de 60% dos doentes, podendo surgir, por vezes, fervores crepitantes discretos. Este quadro clínico ocorre durante um período que pode ir de uma a três semanas [Kovacs *et al.* 1984; Moe & Hardy 1994; Dohn & Frame 1994; Kovacs *et al.* 2001; Barry & Johnson 2001].

Para além destes sintomas, que constituem o quadro clínico típico da pneumocistose pulmonar, pode ainda, ser observada taquipneia, taquicardia, e ocasionalmente cianose, podendo, no entanto, a auscultação ser normal. Existem casos em que a PPc pode “imitar” a asma, em termos de sintomatologia [Schnipper *et al.* 1993; Barry & Johnson 2001]. Nos doentes seropositivos para VIH podem ainda ser observados outros sintomas, tais como, emagrecimento, dores torácicas, astenia e suores nocturnos, relacionados com a evolução da doença e à passagem do estágio de ARC, do inglês *AIDS related complex*, para o estágio de sida [Engelberg *et al.* 1984; Matos 1999]. Nos indivíduos com co-infecção VIH/*P. jirovecii*, várias semanas podem preceder a sintomatologia da PPc, atrasando o diagnóstico. Ao contrário do modo insidioso como a PPc se instala nos doentes com sida, nos imunocomprometidos, seronegativos para VIH, a infecção evolui, rapidamente, para a insuficiência respiratória aguda, acompanhada por uma sintomatologia mais exuberante, embora semelhante à do

doente seropositivo para VIH [Kovacs *et al.* 1984; Moe & Hardy 1994; Dohn & Frame 1994].

O radiograma ao tórax, típico de um doente com PPc, apresenta em 40 a 80% dos casos, uma imagem clássica que se traduz por um padrão de infiltrado intersticial difuso e bilateral [Forrest 1972; Kovacs *et al.* 1984; Moe & Hardy 1994]. Porém, os padrões radiológicos podem ser atípicos em 6 a 20% dos casos de PPc. Assim, o exame radiológico pode apresentar infiltrados intersticiais unilaterais ou localizados, pneumotórax, localização nos lobos superiores ou até apicais, imagens cavitárias ou de abscessos e, embora raramente, derrame pleural [Edelstein & McCabe 1990; Pastores *et al.* 1996; Crans, Jr. & Boisselle 1999]. Grande parte dos casos de pneumocistose, com apresentação radiológica atípica, estão particularmente relacionados com a profilaxia com pentamidina em aerossol, verificando-se o avançar da infecção em áreas menos aerossolizadas, o que reflecte, muito provavelmente, a distribuição desigual deste fármaco no pulmão [Edelstein & McCabe 1990; Barry & Johnson 2001]. Alguns estudos indicam mesmo que, entre 10 e 20% dos casos, o radiograma do tórax pode apresentar uma imagem normal [Kovacs *et al.* 2001; Barry & Johnson 2001]. Num outro estudo, onde se comparam os exames radiográficos de doentes com PPc e a severidade da doença, em termos clínicos, os autores observaram que o radiograma do tórax normal estaria associado com casos menos severos de PPc e com uma menor taxa de mortalidade [Opravil *et al.* 1994].

### 6.3. Infecção extrapulmonar por *Pneumocystis jirovecii*

A presença de *P. jirovecii* tem vindo a ser descrita noutros órgãos e/ou tecidos (sistema linfático e hematopoiético, glândulas endócrinas, mesentério, aparelho gastrointestinal, coração, fígado, baço, medula óssea, rins, músculo, pele, sangue, meninges, córtex cerebral, globo ocular e aparelho auditivo), e geralmente, estas manifestações extrapulmonares só são descobertas quando se recorre a autópsia [Cohen & Stoeckle 1991; Telzak & Armstrong 1994; Ng *et al.* 1997]. As localizações extrapulmonares da infecção por *P. jirovecii* são raras e geralmente concomitantes com localização pulmonar do microrganismo, sugerindo disseminação sistémica, a partir do pulmão, em casos de imunossupressão muito grave, ausência de profilaxia ou profilaxia com pentamidina. A hipótese de disseminação foi já demonstrada no decorrer de um

estudo em ratos imunocompetentes, sugerindo ser a evolução natural da infecção no hospedeiro [Chary-Reddy & Graves 1996; Rabodonirina *et al.* 1997].

Apesar de não ser conhecida, ao certo, qual, ou quais, as vias de disseminação do microrganismo, coloca-se a hipótese deste fenómeno ocorrer pela via linfática e/ou pela via hematógena, pois, os locais mais comuns de detecção extrapulmonar de *P. jirovecii* são os nódulos linfáticos, baço, fígado e medula óssea [Raviglione 1990; Telzak & Armstrong 1994]. Porém, já foram descritos casos de pneumocistose, unicamente, extrapulmonar, confirmando a possibilidade de que o fenómeno de disseminação não é obrigatório para que ocorra este tipo de infecção por *P. jirovecii* [Raviglione 1990; Ellison *et al.* 1995; Terris *et al.* 1996; Ng *et al.* 1997].

Até à data, não está definido se os doentes com sida têm maior probabilidade de desenvolver pneumocistose extrapulmonar do que os doentes imunocomprometidos, seronegativos para VIH. No entanto, antes do início da pandemia de sida, estudos retrospectivos de autópsias em doentes com PPc, apenas permitiram detectar um caso de infecção extrapulmonar. A acompanhar a pandemia de sida, verificou-se, também, um aumento claro dos casos de pneumocistose extrapulmonar. Calcula-se que a incidência da infecção extrapulmonar por *P. jirovecii*, em doentes seropositivos para VIH, se situe entre os 2 e os 3% [Raviglione 1990; Cohen & Stoeckle 1991; Telzak & Armstrong 1994; Ng *et al.* 1997]. Estas percentagens poderão estar subestimadas, pois o diagnóstico destes casos é bastante difícil de estabelecer. Por outro lado, os doentes com sida, actualmente, têm maior esperança de vida, sobrevivendo durante mais tempo, atingindo níveis muito baixos de imunidade, podendo, por isso, estar mais susceptíveis ao fenómeno de disseminação de *P. jirovecii* [Harris 1990; Ng *et al.* 1997].



## 7. Fisiopatologia

### 7.1. Interação parasita-hospedeiro

Tal como qualquer doença infecciosa, a pneumonia por *Pneumocystis* envolve uma interação complexa entre o microrganismo patogénico e o hospedeiro. A patogenicidade de *P. jirovecii* pode ser dividida em quatro estádios [Walzer P.D. 1994; Matos 1999; Thomas, Jr. & Limper 2007]:

- 1) Estabelecimento da infecção, quando o microrganismo penetra no aparelho respiratório do homem, depositando-se no alvéolo pulmonar e aderindo às células epiteliais do tipo I, sem invasão do epitélio;
- 2) Proliferação do agente infeccioso, cujo factor predisponente principal é a deficiência na imunidade celular;
- 3) Alterações no meio alveolar, (I) numa primeira fase (alguns dias após a infecção), após a ligação dos organismos de *P. jirovecii* às células epiteliais tipo I do alvéolo pulmonar, observam-se alterações celulares e reacção inflamatória acompanhada de lesões limitadas, (II) numa segunda fase (após uma a duas semanas de evolução), observam-se aspectos característicos da infecção, como o aparecimento de um exsudado espumoso, arejado, eosinófilo rico em macrófagos, que preenche uniformemente o alvéolo, (III) numa terceira fase (após três a quatro semanas de evolução), observam-se lesões focais de necrose das células epiteliais do tipo I, hipertrofia das células alveolares e preenchimento do espaço alveolar por células de descamação e *P. jirovecii*;
- 4) Resposta imunológica, em que as MSG, o  $\beta$ -1,3-glucano e a manose desempenham um papel fundamental na interação *P. jirovecii*-células do hospedeiro e no reconhecimento pelos linfócitos e macrófagos.

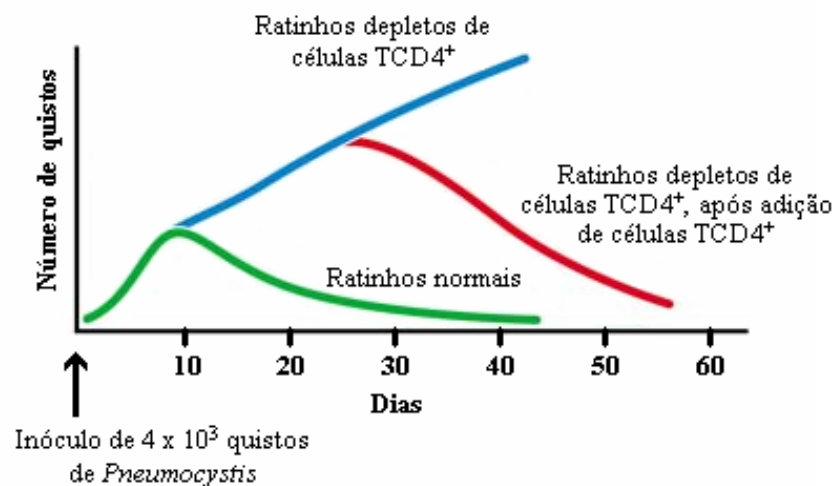
Um passo crucial para o estabelecimento da infecção é a aderência de *Pneumocystis* às células do tecido hospedeiro. *P. jirovecii* estabelece contacto com as células do tipo I do alvéolo pulmonar, e determinadas moléculas, como as fibrolectinas, a laminina e a matriz extracelular, estão implicadas no processo. A formação de aglomerados típicos de células de *P. jirovecii*, conhecidos por “cachos”, característicos deste parasita, bem como a adesão dos trofozoítos às células hospedeiras, são mediadas,

muito provavelmente, por proteínas de superfície e por polissacáridos da parede do microrganismo [Campbell, Jr. 1972; Yoneda & Walzer 1983; Itatani & Marshall 1988; Walzer P.D. 1994; Bava *et al.* 2002].

## 7.2. Resposta imunitária

### 7.2.1. Imunidade celular

Enquanto diferentes genótipos de *P. jirovecii* podem ter importância na severidade dos episódios de PPc, factores intrínsecos ao hospedeiro, como os níveis dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> (figura 9), também estão associados com a evolução da infecção nos doentes. Tanto o sistema imunitário celular como o humoral são importantes na resposta do organismo hospedeiro contra a infecção por *P. jirovecii*.



**Figura 9.** Representação gráfica resumida dos resultados de um estudo experimental que incluiu três grupos de ratinhos. O diagrama demonstra a importância das células TCD4<sup>+</sup> na resposta imunitária à infecção por *Pneumocystis* (adaptado de DeFranco *et al.* 2007).

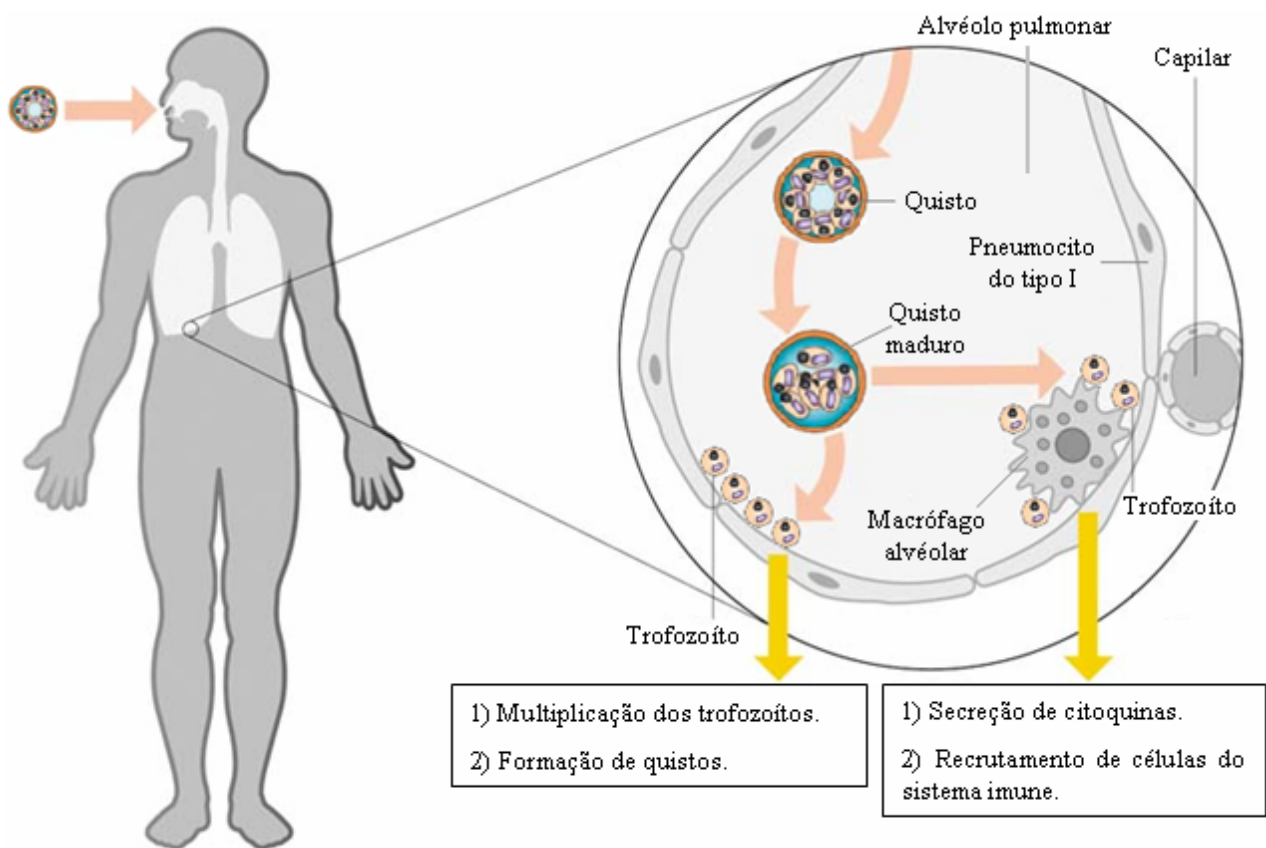
Os níveis de linfócitos TCD4<sup>+</sup> são bastante críticos, pois a esmagadora maioria dos doentes com PPc apresenta um défice acentuado destas células [Roths & Sidman 1992; Dei-Cas 2000; Thomas, Jr. & Limper 2007; Walzer *et al.* 2008]. Estudos laboratoriais efectuados em ratinhos demonstraram que os linfócitos TCD4<sup>+</sup> parecem ser mais importantes na resposta imunitária do hospedeiro, do que os linfócitos TCD8<sup>+</sup>.

Os ratinhos tratados com anticorpos anti-CD4, portanto, com enorme déficit de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, ao serem inoculados com *Pneumocystis*, desenvolveram PPc. Pelo contrário, os ratinhos sujeitos à acção de anticorpos anti-CD8, não desenvolveram infecção por *Pneumocystis* [Beck *et al.* 1996]. Outros estudos, realizados em murinos implicam os linfócitos TCD8<sup>+</sup> como importantes factores de patogenicidade. Nesses estudos, a depleção de ambos os tipos de linfócitos, TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, resultaram em infecção nos animais, mas não em doença. Ao contrário, a depleção apenas dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> resultaram numa pneumonia severa, implicando os linfócitos TCD8<sup>+</sup> como componentes de patogenicidade da PPc, ou evidenciando, por outro lado, a necessidade da presença das células TCD4<sup>+</sup> para que a função anti-*Pneumocystis* dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> seja a adequada. De facto, a inflamação é considerada a causa principal de danos no tecido pulmonar durante a PPc [Wright *et al.* 1999; DeFranco *et al.* 2007; Lu & Lee 2008].

Pensa-se que as contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> no sangue, não reflectam adequadamente os níveis destas células no pulmão, onde a infecção se desenvolve, preferencialmente. A análise de lavados broncoalveolares (LBA), provenientes de doentes seropositivos para VIH, demonstrou que existe uma maior predominância de linfócitos TCD8<sup>+</sup> do que de linfócitos TCD4<sup>+</sup> neste tipo de amostras. Esta diferença é mais evidente nos LBA do que no sangue periférico desses doentes [Barry & Johnson 2001]. No pulmão dos humanos, o mecanismo de infecção/inflamação inclui, muito provavelmente, a libertação de citocinas promovida pelos linfócitos TCD8<sup>+</sup>. A libertação de factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e de interferão gama (IFN- $\gamma$ ) pode levar a um aumento de danos e a uma maior deterioração do espaço alveolar, onde *P. jirovecii* prolifera como parasita extracelular [Barry & Johnson 2001; DeFranco *et al.* 2007]. Um estudo, realizado em doentes com co-infecção VIH/*P. jirovecii* com necessidade de suporte de ventilação mecânica, constatou que a mortalidade no grupo de doentes com contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferiores a 10 células/mm<sup>3</sup> era de 100%. Por outro lado, nos doentes com contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> superiores a 100 células/mm<sup>3</sup>, a mortalidade era de 25% [Kumar & Krieger 1998].

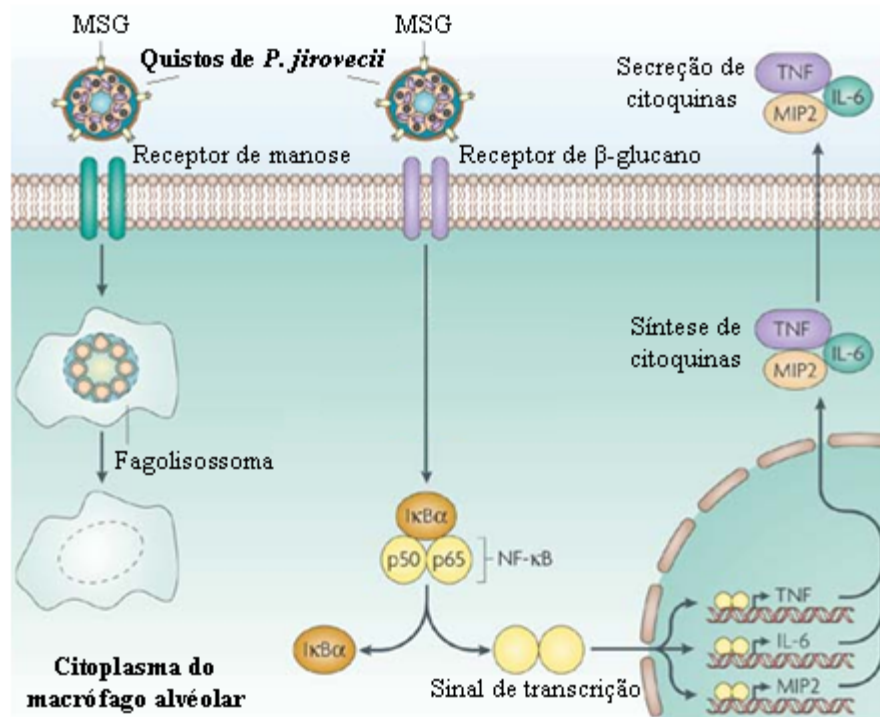
Diversos estudos experimentais demonstraram a importância das proteínas de superfície MSG, de *P. jirovecii*, como componentes antigénicas. Um estudo realizado em ratos revelou que estes produzem linfócitos T, essencialmente do tipo TCD4<sup>+</sup>, em

resposta ao estímulo das MSG de *Pneumocystis*. Ficou demonstrado que os linfócitos T segregam quantidades significativas de citocinas, e que apenas os animais expostos previamente a *Pneumocystis* têm a capacidade de reconhecer o antígeno. Em humanos, os indivíduos com menos de 200 linfócitos TCD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> têm uma resposta proliferativa anti-MSG mais baixa, em comparação com a resposta dos grupos de controlo saudáveis. Por outro lado, os doentes, quando expostos anteriormente a *P. jirovecii*, apresentam uma resposta proliferativa aumentada, quando comparada com a resposta dos indivíduos sem historial clínico de PPc. A resposta celular parece ser o mecanismo principal de defesa contra a infecção por *P. jirovecii* (figura 10) [Theus *et al.* 1993; Theus *et al.* 1998; DeFranco *et al.* 2007].



**Figura 10.** Representação esquemática da infecção e da resposta inata celular ao agente infeccioso *P. jirovecii*. Os trofozoítos multiplicam-se, maturam, e formam novos quistos que são exalados para o ambiente. A produção e secreção de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , pelos macrófagos alveolares conduzem ao recrutamento de células do sistema imunitário e à maturação de células dendríticas (adaptado de DeFranco *et al.* 2007).

Os neutrófilos parecem não contribuir para a degradação do tecido pulmonar durante o processo inflamatório, no entanto, LBA com um elevado número de neutrófilos foram associados a uma maior severidade durante episódios de PPc [Mason *et al.* 1989; Azoulay *et al.* 1999; Swain *et al.* 2004]. Os macrófagos alveolares parecem estar envolvidos, de forma fundamental, na resposta imunitária do hospedeiro (figura 11).



**Figura 11.** Representação esquemática das interações entre *P. jirovecii* e um macrófago alveolar. Os macrófagos são os fagócitos responsáveis pela acção primária contra *P. jirovecii* nos pulmões. O processo de fagocitose ocorre através da interacção entre as MSG de *P. jirovecii* e os receptores de manose do macrófago. O β-glucano da parede celular do parasita induz um mecanismo mediado pelo factor de transcrição nuclear (NF)-κB, do inglês *nuclear factor kappa B*, no qual as proteínas p65/p50 são translocadas para o núcleo, aumentando os níveis de transcrição de citocinas (TNF-α, IL-6 e MIP2), o que leva ao recrutamento de células do sistema imunitário (adaptado de Thomas, Jr. & Limper 2007).

Os macrófagos alveolares interagem com as células de *Pneumocystis* através de diversos tipos de receptores celulares específicos, nos quais se incluem o receptor da manose, o receptor do  $\beta$ -glucano, o receptor Fc *gamma* (Fc- $\gamma$ ), o receptor do complemento, o receptor *scavenger*, e o TLR2, do inglês *toll-like receptor 2*, que reconhece uma vasta gama de ligandos como o peptidoglicano, lipoproteínas e lipopéptidos [Ezekowitz *et al.* 1991; Steele *et al.* 2003; Lund *et al.* 2003; Kedzierska *et al.* 2003; Lu & Lee 2008].

Estas células processam os antígenos de *P. jirovecii* para depois os apresentarem aos linfócitos T naives, activando-os e tornando-os, consequentemente, células T-*helper* ou células T-citotóxicas. Nos doentes com PPc, verifica-se um aumento de citocinas importantes para o processo inflamatório. O TNF- $\alpha$ , a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), a interleucina 8 (IL-8), a proteína MIP2, do inglês *macrophage inflammatory protein 2*, e o factor GM-CSF, do inglês *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*, são produzidas pelos macrófagos alveolares e libertadas nos alvéolos pulmonares, promovendo o recrutamento de neutrófilos e de linfócitos para o local da infecção [Chen *et al.* 1992; Hoffman *et al.* 1993; Mandujano *et al.* 1995; Benfield *et al.* 1995; Thomas, Jr. & Limper 2007; Lu & Lee 2008]. Estudos experimentais, onde *Pneumocystis* foi inoculado por via transtraqueal em ratos depletos de macrófagos alveolares, demonstraram que, nesses animais, não ocorreu a eliminação de *Pneumocystis*, ficando evidente que os macrófagos alveolares desempenham um papel fundamental na eliminação do parasita [Limper *et al.* 1997]. Adicionalmente, ficou também demonstrado, para o modelo animal, que, se durante uma infecção por *Pneumocystis*, for administrado GM-CSF (factor que estimula a activação dos macrófagos alveolares) vai haver um decréscimo da severidade da PPc [Mandujano *et al.* 1995; Paine, III *et al.* 2000].

### 7.2.2. Imunidade humoral

A acção do sistema humoral na resposta do hospedeiro à PPc é sugerida por diversos estudos [Saulsbury *et al.* 1979; Roths & Sidman 1992; Alibrahim *et al.* 1998; Lee *et al.* 1998; Bartlett *et al.* 1998], os quais demonstraram que:

- 1) Ratinhos SCID, do inglês *Severe Combined Immunodeficiency*, necessitam de linfócitos do tipo B para eliminar as células do parasita;
- 2) Doentes com agammaglobulinemia podem desenvolver PPc, apesar de possuírem um sistema celular imune intacto;
- 3) A injeção intraperitoneal de soro proveniente de ratinhos recuperados de pneumocistoses em ratinhos depletos de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, confere protecção parcial contra *Pneumocystis*;
- 4) A injeção subcutânea de anticorpos anti-*Pneumocystis* em ratos também confere protecção parcial contra a PPc.

Em trabalhos de investigação, onde foram pesquisados anticorpos anti-*P. jirovecii* da classe IgG, em humanos, foi detectada uma prevalência superior a 85% para as IgG que reconheceram uma fracção antigénica específica, correspondente ao antígeno p55, isolado de *Pneumocystis* de rato, que é um reconhecido indicador de infecção [Kovacs *et al.* 1989b; Peglow *et al.* 1990]. Com o método de ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*, 30% das crianças entre um e nove anos de idade, 56% das crianças e adolescentes entre os 10 e 19 anos de idade, bem como, 50 a 60% dos adultos, imunocompetentes, apresentaram IgG anti-MSG de *Pneumocystis* [Lundgren *et al.* 1993]. Num outro estudo, realizado em doentes com PPc, quer com co-infecção VIH/*P. jirovecii*, quer imunocomprometidos, seronegativos para VIH, foram identificados anticorpos IgG anti-MSG em 12% dos casos e anticorpos IgM anti-*P. jirovecii*, contra um ou mais antígenos, em 10 a 20% dos doentes [Peglow *et al.* 1990]. A resposta humoral, embora parcial, parece ter alguma importância na resposta imunitária contra *P. jirovecii*, pois alguns estudos, com o modelo animal, indicam que a administração profilática de linfócitos sensibilizados, anticorpos anti-*Pneumocystis*, ou mesmo de antígenos isoladas directamente de *Pneumocystis*, provoca a diminuição da carga parasitária nos alvéolos pulmonares dos animais em estudo [Gigliotti & Hughes 1988; Theus *et al.* 1995].

## 8. Diagnóstico

### 8.1. Introdução ao diagnóstico da pneumocistose

Até à década de 80 do século passado, a pneumocistose era considerada uma doença rara, mas potencialmente mortal, que afectava doentes imunocomprometidos, tais como receptores de órgãos transplantados, doentes oncológicos submetidos a quimioterapia, indivíduos com doenças autoimunes e crianças malnutridas. Verificava-se que a PPc evoluía rapidamente nestes doentes, tornando-se, em muitos dos casos, uma pneumonia fulminante numa questão de dias [Sepkowitz 1993; Cushion 2004; Peterson & Cushion 2005]. Era comum que o diagnóstico fosse efectuado de forma invasiva para o doente, normalmente através de biopsias pulmonares. O advento da sida veio aumentar de forma exponencial a ocorrência de casos de pneumocistose. Antes da implementação da profilaxia anti-*P. jirovecii*, esta infecção oportunista liderava a lista das causas de morte nos doentes seropositivos para VIH, mas, actualmente, a PPc é, na esmagadora maioria dos casos, facilmente diagnosticável, sendo, também, possível recorrer a tratamentos eficazes, o que faz reduzir a morbilidade e a mortalidade provocadas por *P. jirovecii* [Barry & Johnson 2001].

Sabe-se que a apresentação da pneumocistose está dependente da doença imunossupressiva adjacente, pois, ao longo dos anos, os clínicos verificaram que nos doentes com sida, mais de 25 dias podem preceder a sintomatologia da PPc, tornando o diagnóstico mais difícil do que nos doentes com outras imunodeficiências, em que os sintomas surgem num intervalo de tempo entre os 5 e os 10 dias [Kovacs *et al.* 1984; Dohn & Frame 1994; Dei-Cas 2000]. O diagnóstico clássico e definitivo da PPc baseia-se na observação microscópica de *P. jirovecii* em secreções pulmonares por meio de técnicas de coloração histoquímica, que são de execução simples, mas que coram em simultâneo outros microrganismos, dependendo o diagnóstico correcto de um técnico experiente. Por outro lado, este diagnóstico pode ser feito, também, por colorações imuno específicas (imunofluorescência directa/indirecta com anticorpos monoclonais) [Baughman 1994; Matos *et al.* 2008].



## 8.2. Diagnóstico presuntivo

Para o diagnóstico presuntivo da pneumocistose, são considerados diversos parâmetros clínicos, que no seu conjunto podem ser indicativos da doença. A apresentação do quadro clínico, os testes de função pulmonar, a gasimetria arterial em repouso e após exercício, os exames radiológicos e laboratoriais inespecíficos, são os elementos que compõem o fundamento do diagnóstico presuntivo [Matos 1999; Matos *et al.* 2008]. Em estudos efectuados entre o final da década de 80 e princípio da década de 90, do século passado, 85% dos doentes com PPc demonstravam contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferiores a 250 células/mm<sup>3</sup>. Desta forma, a avaliação do estado imunitário do doente é um parâmetro importante na avaliação do risco que o doente tem de desenvolver infecção por *P. jirovecii*. Actualmente, reconhece-se que a probabilidade de doentes seropositivos para VIH desenvolverem PPc aumenta consideravelmente quando a contagem de linfócitos do fenótipo TCD4<sup>+</sup> no sangue periférico é inferior a 200 células/mm<sup>3</sup> [Masur *et al.* 1989; Moe & Hardy 1994; Kaplan *et al.* 1998]. Por outro lado, o quadro clínico de doentes seropositivos para VIH com dispneia e infiltrados pulmonares, que apresentem, por exemplo, uma contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> de 500 células/mm<sup>3</sup>, dificilmente está relacionado com pneumocistose. Nos doentes imunocomprometidos, seronegativos para VIH, o risco de colonização pulmonar por *P. jirovecii* está significativamente associado com contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferiores a 400 células/mm<sup>3</sup> e a uma razão TCD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> inferior a 1 [Nevez *et al.* 1999].

O quadro clínico típico de um doente com PPc inclui sintomas como: febre, tosse não produtiva e dispneia. A apresentação radiológica clássica da PPc traduz-se por um padrão intersticial bilateral, podendo no entanto variar em função do grau de imunossupressão, da presença de outras infecções concomitantes, ou da utilização de fármacos específicos, como é o caso da pentamidina [Moe & Hardy 1994; Barry & Johnson 2001; Thomas, Jr. & Limper 2007]. Tendo em conta que a PPc é uma doença intersticial, e como tal, provoca graves dificuldades nas trocas gasosas que ocorrem no pulmão, um outro parâmetro utilizado no diagnóstico presuntivo é a gasimetria arterial. Os testes de função pulmonar de doentes com pneumocistose mostram que 80% dos casos podem revelar hipoxemia, ou pelo menos, aumento do gradiente de oxigénio alvéolo-arterial, que se agrava com o exercício. Uma pressão parcial do oxigénio (PaO<sub>2</sub>)

no sangue periférico inferior a 65 mmHg é indicativa de PPc, sendo de considerar que 10 a 20% dos casos de PPc apresentam níveis normais de PaO<sub>2</sub> [Stover *et al.* 1989; Brooks *et al.* 1993; Baughman 1994; Barry & Johnson 2001].

A desidrogenase láctica, do inglês *lactate dehydrogenase* (LDH), é uma enzima estável do citoplasma, que é libertada quando há destruição da membrana citoplasmática das células do hospedeiro. Os níveis de LDH são elevados nos doentes com infecção por *P. jirovecii*, podendo o seu doseamento no soro ser útil para verificar o estado da doença e para avaliar a resposta à terapêutica. Porém, alguns estudos indicam que entre sete e 17% dos doentes com PPc apresentam níveis normais de LDH, correspondendo, provavelmente, a casos de infecções pouco severas e, por isso, com menor actividade lítica. Infelizmente, o aumento da LDH não é exclusivo da PPc, sendo também comum para outras doenças [Zaman & White 1988; Tasaka *et al.* 2007]. O  $\beta$ -glucano, um dos principais componentes da parede celular dos quistos de *P. jirovecii*, parece ser outra molécula interessante para o diagnóstico de PPc. Trabalhos de investigação recentes mostraram que o  $\beta$ -glucano pode ser detectado no soro ou no plasma dos doentes, existindo uma forte correlação entre os seus níveis e a gravidade das infecções fúngicas. Esses estudos sugerem também que é possível distinguir a infecção causada por *P. jirovecii* de outras infecções fúngicas, tornando-o um potencial marcador serológico de diagnóstico para a PPc [Teramoto *et al.* 2000; Tasaka *et al.* 2007]. Outros estudos, efectuados em culturas *in vitro*, permitiram verificar que *Pneumocystis* não tem capacidade de sintetizar S-adenosilmetionina, recorrendo ao espaço extracelular para obter o metabolito (fundamental nas reacções de metilação e síntese de poliaminas). Observou-se que a concentração média de S-adenosilmetionina em doentes com suspeita de PPc era de 8 nmol/L, enquanto que em indivíduos saudáveis era de 106 nmol/L. Após tratamento, os doentes com PPc, apresentavam concentrações do metabolito idênticas às verificadas nos indivíduos saudáveis. A medição da variação dos níveis de S-adenosilmetionina pode ser útil, como complemento no diagnóstico da infecção, bem como na avaliação da resposta à terapêutica anti-*P. jirovecii* [Merali & Clarkson, Jr. 2004; Skelly *et al.* 2008].

Pelo facto da população em geral apresentar elevadas percentagens de portadores de anticorpos anti-*P. jirovecii*, os exames sero-imunológicos têm pouco interesse, pois é difícil determinar o título com valor de diagnóstico. As técnicas de

ELISA, contra-imuno-electroforese e a aglutinação de partículas de látex sensibilizadas, que permitem a determinação de antígenos circulantes no soro, são pouco sensíveis, tendo por isso reduzido valor de diagnóstico [McNabb *et al.* 1988; Hughes 1998].

### 8.3. Diagnóstico definitivo

#### 8.3.1. Amostras clínicas

O diagnóstico da PPc é determinado por um exame histopatológico em amostras obtidas por técnicas invasivas, como a biopsia pulmonar ou o lavado broncoalveolar (LBA), e em amostras obtidas por técnicas não invasivas, como a expectoração induzida (EI), a expectoração espontânea, o lavado oral (LO), as secreções brônquicas, ou o aspirado nasofaríngeo. Actualmente, o LBA e a EI são as amostras clínicas mais utilizadas para o diagnóstico da pneumocistose [Matos 1999; Barry & Johnson 2001; Costa 2006].

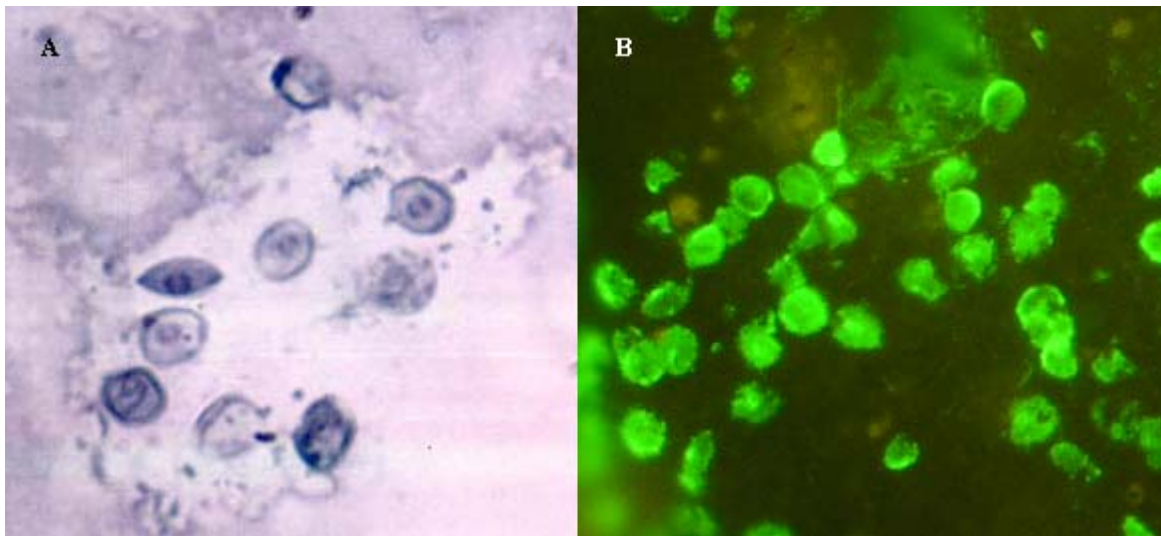
A colheita do líquido do LBA é efectuada por broncofibroscopia, no lobo médio, permitindo a visualização de *P. jirovecii* em mais de 80% dos casos de infecção [Gosey *et al.* 1985]. Devido ao facto da recolha do LBA ser feita por um método invasivo, em crianças de tenra idade, procede-se à lavagem e aspiração dos brônquios principais, para recolha das secreções brônquicas [Matos 1999]. A EI é obtida pela inalação de um soro salino a 1,8% durante 10 a 15 minutos, o que promove o aumento da transudação e a exfoliação traqueobrônquicas. Na maioria dos casos de PPc, a obtenção de amostras de secreções pulmonares para estudo citológico, através deste método não invasivo, é suficiente, sendo possível a visualização de *P. jirovecii*, após coloração com um corante não específico, em 30 a 70% dos casos de infecção. Quando associada à técnica de imunofluorescência com anticorpos monoclonais (IF/AcM) anti-*P. jirovecii*, a sensibilidade da EI aumenta para níveis que se situam nos 85% [Zaman *et al.* 1988; Baughman *et al.* 1989; Ng *et al.* 1989; Ng *et al.* 1990; Matos *et al.* 1995]. Por se tratar de uma técnica simples e não invasiva, o LO também tem vindo a ser avaliado para o diagnóstico da PPc, através de técnicas de detecção de DNA de *P. jirovecii*, como é o caso da reacção de polimerização em cadeia (PCR), do inglês *polymerase chain reaction*. O LO é obtido por gargarejo com um soro salino, permitindo a detecção de DNA de *P. jirovecii* em 75 a 89% dos casos de infecção [Wakefield *et al.* 1993;

Helweg-Larsen *et al.* 1997; Matos *et al.* 2001]. Para o diagnóstico da pneumocistose extrapulmonar, efectua-se biopsia dos tecidos afectados, seguida de exame histopatológico dos fragmentos do tecido [Moe & Hardy 1994].

### 8.3.2. Métodos histoquímicos para pesquisa directa

Vários métodos de coloração histoquímica estão descritos para a pesquisa de organismos de *P. jirovecii* em amostras pulmonares. Parte destes métodos citoquímicos coram a parede dos quistos, como é o caso da coloração pela metenamina prata, pelo azul de toluidina ou pelo calcoflúor, outros métodos coram os trofozoítos e os corpos intraquísticos, como é o caso da coloração pelo Giemsa [Milder *et al.* 1980; Matos 1999; Costa 2006].

A coloração pela metenamina prata (GMS), do inglês *Gomori methenamine-silver stain*, é considerada a técnica de coloração histoquímica de referência, no diagnóstico da PPc. Esta técnica argêntica cora de cinzento-escuro, a parede dos quistos de *P. jirovecii*, não corando o seu conteúdo, nem os trofozoítos (figura 12.A). Também, cora leveduras que se assemelham aos quistos de *P. jirovecii*, dificultando a leitura microscópica das lâminas, requerendo técnicos experientes para a sua execução e leitura [Musto *et al.* 1982; Moe & Hardy 1994]. As técnicas de coloração pelo azul de toluidina, que deixa a parede quística corada de azul claro-lavanda, e pelo calcoflúor, que permite uma coloração fluorescente da parede quística, também demonstram reduzida especificidade para a detecção de *P. jirovecii* [Gosey *et al.* 1985; Baselski *et al.* 1990]. Quer a coloração pelo Giemsa, quer a técnica modificada de coloração pelo Giemsa (*Diff-Quick*), coram os trofozoítos e os corpos intraquísticos, que apresentam núcleo corado de vermelho, rodeado pelo citoplasma azulado. São técnicas inespecíficas e de leitura ambígua, pois é problemático diferenciar os trofozoítos dos restantes fragmentos celulares que compõem a lâmina [Holten-Andersen & Kolmos 1989]. Um estudo demonstrou que, apesar de ser uma técnica rápida e pouco onerosa, a *Diff-Quick* permite a detecção de *P. jirovecii* em apenas 76% de amostras de casos de PPc, enquanto que a GMS, embora mais morosa e onerosa, permite a detecção de 86% dos casos de PPc [Chandra *et al.* 1988].



**Figura 12.** Quistos de *P. jirovecii*, corados por duas técnicas de referência, em secreções pulmonares. Na fotografia A, podem-se observar as formas quísticas coradas pela técnica de metenamina prata (x1000) [Matos 1999]. Na fotografia B, os quistos de *P. jirovecii* podem ser visualizados pela técnica de IFI com AcM (x1000) (original do autor).

### 8.3.3. Métodos imuno específicos

A caracterização de antígenos de superfície de *Pneumocystis* veio permitir o desenvolvimento de anticorpos específicos e a aplicação de novas técnicas de coloração por imunofluorescência (IF), quer directa, quer indirecta. No final dos anos 80 do século passado, surgiram as primeiras técnicas de coloração com anticorpos fluorescentes específicos. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais (AcM), que reagem com antígenos de superfície da parede celular de *Pneumocystis*, fez com que, em 1988, fosse desenvolvida uma técnica de diagnóstico por imunofluorescência, que apesar de mais onerosa e de requerer equipamento especial, demonstrou ser muito mais sensível e específica do que as técnicas histoquímicas convencionais, em particular, quando aplicadas a espécimes com tendência a terem menores cargas parasitárias, como as EI e as secreções brônquicas.

A comparação entre diversos estudos onde a sensibilidade das técnicas de IF foi avaliada em secreções pulmonares, demonstram que, efectivamente, as técnicas de IF são mais sensíveis do que as técnicas de coloração convencionais. Esses estudos

determinaram que os níveis de sensibilidade das técnicas de IF se situam entre os 90 e 97%, sempre superiores às técnicas histoquímicas, tais como, a GMS (81 a 91%), a coloração pelo Giemsa (76 a 92%), ou a coloração pelo azul de toluidina (80%). Num estudo efectuado em Portugal, verificaram-se níveis de sensibilidade bastante mais reduzidos para as técnicas histoquímicas (33%), confirmando as técnicas de coloração por IF como os métodos de diagnóstico morfológico de *P. jirovecii* mais sensíveis (88%) [Kovacs *et al.* 1988; Baughman *et al.* 1989; Ng *et al.* 1990; Matos *et al.* 1995; Lautenschlager *et al.* 1996; Kovacs *et al.* 2001; Turner *et al.* 2003; Nassar *et al.* 2006].

As técnicas de IF coram de verde maçã fluorescente os quistos (redondos ou ovais com 4 a 7  $\mu\text{m}$ ) e os trofozoítos (forma de meia lua ou polimórficos com 1 a 5  $\mu\text{m}$ ) (figura 12.B). A IF directa com AcM fundamenta-se na ligação dos anticorpos específicos, marcados com fluoresceína, a antígenos de superfície de *Pneumocystis*. Por microscopia de fluorescência, pode-se avaliar a presença ou ausência de *Pneumocystis*, pela emissão de cor característica de estruturas compatíveis. Contudo, a imunofluorescência indirecta (IFI) com AcM é, actualmente, devido à sua fiabilidade, a técnica mais utilizada no diagnóstico da PPc. Os AcM reagem especificamente com antígenos de superfície do microrganismo. De seguida, aos AcM ligam-se anti-anticorpos específicos, conjugados com um marcador fluorescente, que quando exposto a uma fonte de luz com o devido comprimento de onda, fica com as suas moléculas excitadas, emitindo fluorescência com uma cor característica. Pela observação ao microscópio de fluorescência, determina-se a presença ou ausência do microrganismo através da cor emitida pelas estruturas características [Baughman *et al.* 1989; Bava *et al.* 2002].

Para aumentar a especificidade da técnica de IF, pode aplicar-se uma técnica enzimática, que por digestão parcial da parede dos quistos de *Pneumocystis*, expõe antígenos, que não estão directamente acessíveis à superfície do microrganismo e, que podem funcionar como alvos dos AcM [Lautenschlager *et al.* 1996].

#### 8.3.4. Métodos moleculares

A inexistência de meios de cultura eficientes e reprodutíveis, que permitam o isolamento e a multiplicação de *P. jirovecii*, obtido de material biológico de doentes, dificulta o diagnóstico deste microrganismo pelas técnicas clássicas de uso corrente, em

especial nos casos em que as amostras biológicas apresentam baixas cargas parasitárias [Sloand *et al.* 1993; Stringer 1996; Beck & Cushion 2009]. Nas últimas duas décadas, os progressos obtidos na área da biologia molecular vieram permitir, não só um enorme avanço na caracterização genotípica de um elevado número de microrganismos patogénicos, mas também, contribuiu de forma decisiva para a melhoria do diagnóstico de infecções provocadas por esses agentes, através do desenvolvimento de técnicas inovadoras, como por exemplo a PCR. Esta técnica molecular permite a detecção de *P. jirovecii*, através da amplificação de DNA.

A sequência de ácidos nucleicos é característica e única para cada organismo, conferindo a esta técnica elevada especificidade [Wakefield *et al.* 1990a; Tamburrini *et al.* 1993]. Em 1990, Ann Wakefield e colaboradores publicaram os primeiros trabalhos onde foi aplicada a tecnologia de PCR para a detecção de *Pneumocystis*, através da amplificação da sequência da subunidade grande de rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*), isolado a partir de pulmão infectado, de rato e de homem [Wakefield *et al.* 1990a; Wakefield *et al.* 1990b]. Desde então, foram desenvolvidas várias técnicas para a detecção deste organismo por amplificação de DNA através da PCR. Para além da *mtLSU rRNA*, a PCR pode ser aplicada numa variedade de substratos genéticos. Os métodos que apresentam maior sensibilidade englobam genes multicópia, como alvo da reacção, ou protocolos que implicam PCR *nested* que requerem duas fases de amplificação [Moonens *et al.* 1995; Matos *et al.* 2000; Kovacs *et al.* 2001].

Em comparação com as técnicas de detecção morfológica, a maioria dos estudos, confirma que as técnicas de PCR apresentam alta sensibilidade e especificidade, sempre a rondar os 100%, embora variáveis, dependendo do produto biológico utilizado [Atzori *et al.* 1998; Torres *et al.* 2000]. A PCR permite a detecção de *P. jirovecii* em amostras clínicas (LBA, EI, expectoração espontânea, LO, secreções brônquicas, aspirado nasofaríngeo, soro, sangue) e ambientais [Wakefield *et al.* 1993; Olsson *et al.* 1993; Atzori *et al.* 1995; Lundgren & Wakefield 1998; Nevez *et al.* 2001; Matos *et al.* 2001; Matos *et al.* 2003a; Matos *et al.* 2006]. O método de PCR *nested* tem sido usado com sucesso em amostras biológicas recolhidas do aparelho respiratório superior, onde o número de organismos de *P. jirovecii* é tendencialmente baixo. Enquanto os LO podem ser obtidos em doentes com PPc severa, nos quais as técnicas mais invasivas se tornam bastante agressivas e difíceis de executar, os aspirados nasofaríngeos, podem ser

facilmente obtidos em doentes pediátricos, sendo que ambos os tipos de amostra têm sido utilizados com sucesso no diagnóstico da pneumocistose por PCR [Wakefield *et al.* 1993; Olsson *et al.* 1996a; Nevez *et al.* 2001]. Alguns estudos mostram que a sensibilidade da PCR para detectar *P. jirovecii* em amostras orofaríngeas situa-se entre os 50 e os 70%, mais reduzida do que nas amostras de LBA, onde a sensibilidade atinge os 100% [Atzori *et al.* 1998; Huang *et al.* 1999; Pinlaor *et al.* 2004]. A detecção de DNA de *P. jirovecii* em amostras de soro e de sangue tem demonstrado algum potencial, embora com resultados díspares. Estudos indicam que somente em alguns casos, onde se observa disseminação da infecção por *P. jirovecii*, se consegue detectar DNA do microrganismo através da PCR, em amostras de sangue. A utilidade deste tipo de amostras para o diagnóstico da PPc permanece por esclarecer [Tamburrini *et al.* 1994; Atzori *et al.* 1995; Matos *et al.* 1999].

Recentemente, técnicas de PCR em tempo real, RT-PCR do inglês *real time polymerase chain reaction*, foram também testadas para a detecção de *P. jirovecii* em amostras biológicas. Esta metodologia, fornece, não só dados qualitativos em relação à presença do agente patogénico, mas também, permite a quantificação de *P. jirovecii* nos espécimes pulmonares. Apesar de mais dispendiosa que a PCR normal, a RT-PCR demonstra maior rapidez na obtenção de resultados e elevados níveis de sensibilidade e especificidade no diagnóstico e quantificação de *P. jirovecii*. Estudos demonstram que a sensibilidade (94%) desta técnica é semelhante aos valores da PCR *nested*, habitualmente utilizado para o diagnóstico molecular. Por outro lado, a sua especificidade (96%) é superior à da PCR *nested*, permitindo o aparecimento de menos potenciais falsos positivos [Alvarez-Martinez *et al.* 2006; Arcenas *et al.* 2006; Huggett *et al.* 2008; Rohner *et al.* 2009].

Diversos autores [Lundgren & Wakefield 1998; Wakefield 2002; Miller *et al.* 2002; Medrano *et al.* 2005; Rivero *et al.* 2008] sugerem que, para além da sensibilidade e especificidade que apresenta a nível do diagnóstico, a PCR, aliada a métodos não invasivos, de obtenção de produtos biológicos, pode ser aplicada na monitorização de:

- 1) Doentes sob terapêutica ou profilaxia anti-*P. jirovecii*;
- 2) Doentes com elevado risco de desenvolverem PPc;
- 3) Estudos epidemiológicos, que podem incluir a população em geral, portadores assintomáticos, ou amostras ambientais.



## 9. Prevenção e tratamento da pneumocistose

### 9.1. Introdução às opções terapêuticas

Nos anos 80 do século passado, com o início da epidemia de sida, a pneumocistose tornou-se uma doença frequente. Nessa altura, apenas três fármacos se encontravam entre as opções terapêuticas anti-*P. jirovecii*: a pentamidina, a pirimetamina-sulfadiazina e o trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) [Ivány & Páldy 1958; Frenkel *et al.* 1966; Hughes *et al.* 1974; Hughes *et al.* 1977]. Desde então, a investigação de novos fármacos com efeitos anti-*P. jirovecii* foi impulsionada. Diversos estudos demonstraram que moléculas específicas provocam a inibição de importantes enzimas do metabolismo de *Pneumocystis*. Desses estudos, destacam-se aqueles que incidiram sobre as enzimas da via biossintética do ácido fólico, como a DHFR, TS e DHPS, o citocromo *b*, e a  $\beta$ -1,3-glucano sintetase, que, recentemente, ganhou uma maior importância, com o desenvolvimento de fármacos anti-fúngicos, cuja capacidade é, precisamente, a inibição desta enzima [Edman *et al.* 1989a; Kovacs *et al.* 1989a; Schmatz *et al.* 1991; Hughes *et al.* 1993].

### 9.2. Profilaxia da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

Antes da implementação da profilaxia contra a PPc e do uso alargado da HAART, a infecção por *P. jirovecii* ocorria em 60 a 80% dos doentes com VIH/sida [Moe & Hardy 1994; Lundberg *et al.* 2000]. Estudos mostram que, quer a implementação de regimes profiláticos com fármacos eficazes, quer a utilização da HAART, contribuíram decisivamente para o declínio da frequência desta doença, que na Europa Ocidental e nos E.U.A., passou a ocorrer numa taxa de dois a três casos por cada 100 pessoas/ano [Furrer *et al.* 1999]. Para além dos doentes com sida, a profilaxia primária deve ser considerada noutros grupos de doentes, tais como, crianças com leucemia, ou com deficiências imunitárias combinadas, transplantados de órgãos, entre outros doentes imunocomprometidos [Hughes *et al.* 1977; Kramer *et al.* 1992; Hughes 1994].

É reconhecido que doentes com contagens de linfócitos do fenótipo TCD4<sup>+</sup> no sangue periférico, inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, apresentam alto risco de desenvolver a doença [Masur *et al.* 1989; Kovacs & Masur 1992; Kaplan *et al.* 1998]. Esse risco,

também, é maior nos doentes com episódio anterior de pneumocistose, do que nos indivíduos que nunca sofreram da doença. Assim, a profilaxia da PPc pode ser dirigida contra a infecção primária (primeiro episódio), ou secundária (recaída). A profilaxia primária retarda a primo-infecção entre 6 a 12 meses, devendo ser instituída nos doentes com contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup> no sangue periférico e/ou febre de etiologia desconhecida, história de candidíase orofaríngea e outras infecções oportunistas indicadoras de imunossupressão [Kovacs & Masur 1992; Hoover *et al.* 1993; Kaplan *et al.* 1998]. A profilaxia secundária é indicada, de forma vitalícia, para doentes com episódio anterior de PPc. Assim, nos casos de recaída, é recomendada a instituição de um regime profilático vitalício, independente do valor da contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> no sangue periférico. No entanto, estudos indicam que a profilaxia (primária e secundária) pode ser descontinuada na ausência de sintomas e quando as contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> no sangue periférico superam as 200 células/mm<sup>3</sup> e assim permanecem por um período de três a seis meses. [Weverling *et al.* 1999; Koletar *et al.* 2001; Kaplan *et al.* 2002; Masur *et al.* 2002; Zellweger *et al.* 2004].

Fármacos como o TMP-SMZ, a pentamidina, a dapsona e a atovaquona, podem ser utilizados na profilaxia contra a pneumocistose (quadro II). Estudos indicam que a acção profilática do TMP-SMZ é superior à da pentamidina inalada. Para além deste facto, o TMP-SMZ tem o benefício de também promover protecção contra a toxoplasmose, prevenir infecções bacterianas no tracto respiratório e de apresentar baixos custos [Antinori *et al.* 1995; El-Sadr *et al.* 1998; Matos *et al.* 2008]. Outros estudos indicam que a dapsona demonstrou ter uma eficácia, a nível profilático, muito semelhante, à pentamidina inalada ou à atovaquona, mas consideravelmente menor, quando comparada com o TMP-SMZ. Por seu lado, a atovaquona, com uma capacidade profilática semelhante à da dapsona, é de modo geral, melhor tolerada pelos doentes [Schneider *et al.* 1992; Martin *et al.* 1992; Hoover *et al.* 1993; Bozzette *et al.* 1995]. Desta forma, o TMP-SMZ, que combina o trimetoprim (TMP) e o sulfametoxazol (SMZ), é o fármaco de primeira escolha para a profilaxia (primária e secundária) anti-*P. jirovecii* [Schneider *et al.* 1992; Benson *et al.* 2004; Matos *et al.* 2008]. Um estudo onde foram incluídos três grupos de doentes com profilaxia anti-*P. jirovecii* utilizando TMP-SMZ em doses elevadas, TMP-SMZ em doses baixas e pentamidina inalada, demonstrou que o TMP-SMZ foi eficaz, independentemente da dose,

confirmando um efeito profilático superior, quando comparado com a acção da pentamidina. Contudo, os efeitos secundários manifestaram-se mais cedo no grupo de doentes onde foi utilizada uma dose elevada de TMP-SMZ [Ioannidis *et al.* 1996].

Apesar da sua superioridade como agente profilático de primeira linha, o TMP-SMZ está associado a uma incidência significativa de efeitos secundários. Num estudo, observou-se que, em comparação com a pentamidina inalada, a descontinuidade do regime profilático, devido a efeitos tóxicos, foi sete vezes mais frequente quando utilizado o TMP-SMZ, e quatro vezes mais frequente quando aplicada dapsona [Schneider *et al.* 1992; May *et al.* 1994]. Nos casos de reacções adversas ao TMP-SMZ, a pentamidina em aerossol é uma alternativa, relativamente, eficaz e bem tolerada. Outro regime profilático alternativo é a combinação dapsona-pirimetamina, indicada para doentes com serologia positiva para toxoplasmose e contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferior a 100 células/mm<sup>3</sup> no sangue periférico [Klein *et al.* 1992; May *et al.* 1994; Antinori *et al.* 1995; Opravil *et al.* 1995].

### 9.3. Tratamento da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

O tratamento da pneumocistose pode ser feito recorrendo ao TMP-SMZ, pentamidina por via intravenosa, primaquina-clindamicina, dapsona-TMP, dapsona-atovaquona, sulfadiazina, pirazinamida, trimetrexato-leucovorina e eflornitina [Hughes *et al.* 1974; Masur 1992a; Safrin *et al.* 1996; Barry & Johnson 2001; Matos *et al.* 2008]. A inibição do metabolismo dos folatos é, reconhecidamente, a melhor forma de prevenir o crescimento de *P. jirovecii*. Estudos efectuados, quer no modelo animal, quer no homem, documentaram que a inibição combinada das enzimas dihidropteroato sintetase (DHPS) e dihidrofolato reductase (DHFR), da via de síntese dos folatos, resulta na inibição sinérgica do crescimento de *Pneumocystis*. O SMZ, a sulfadiazina e a dapsona podem ser utilizados na inibição da DHPS, enquanto que a inibição da DHFR pode ser promovida pelo TMP, pela pirazinamida e pelo trimetrexato [Hughes *et al.* 1975; Haverkos 1984; Masur 1992a].

A combinação de fármacos utilizada como referência no tratamento da PPc, independentemente da forma de apresentação e da gravidade da infecção, é o TMP-SMZ. O tratamento, com esta combinação, apresenta uma eficácia que se situa entre os 70 e os 90%, proporcional à sua duração [Shelhamer *et al.* 1984; Klein *et al.*

1992; Masur 1992a; Moe & Hardy 1994]. As reacções adversas podem surgir durante a segunda semana de tratamento, sendo mais frequentes nos doentes com VIH/sida. Os efeitos secundários podem ser controlados pela redução da posologia ou por tratamento sintomático, podendo no entanto, conduzir à interrupção do tratamento [Sattler *et al.* 1988; Al-Tawfiq *et al.* 1999]. Nos casos de hipersensibilidade ou de resposta inadequada à terapia com TMP-SMZ, a pentamidina (fármaco de segunda linha) é considerada como alternativa. Esta diamina aromática, é um reconhecido anti-protozoário, cuja acção não é totalmente conhecida, mas que aparentemente, inibe a incorporação de ácido para-aminobenzóico, e actua a nível mitocondrial, ligando-se ao RNA de transcrição (tRNA), inibindo o mecanismo de tradução de DNA [Sattler *et al.* 1988; Klein *et al.* 1992; Kim *et al.* 2008; Sun & Zhang 2008]. Estudos indicam que a eficácia da terapêutica com pentamidina administrada por via intravenosa, é de 70 a 95%, sendo comparável à eficácia do TMP-SMZ, quer nos casos de PPc com gravidade moderada, quer nos casos de gravidade elevada [Conte, Jr. & Golden 1988; Sattler *et al.* 1988]. São conhecidos diversos efeitos secundários da pentamidina, que podem ser reversíveis, após redução da dose intravenosa administrada, ou se esta passar a ser administrada por aerossol, nos casos que o permitam [Montgomery *et al.* 1995]. No entanto, comparando com o TMP-SMZ, os níveis de eficácia da pentamidina são menores, especialmente em infecções de gravidade elevada, se esta for administrada por aerossol [Klein *et al.* 1992]. Num estudo, onde o TMP-SMZ e a pentamidina foram utilizados no tratamento de PPc, com todos os graus de gravidade, 80% dos doentes sob terapêutica com TMP-SMZ e 69% dos doentes tratados com pentamidina tiveram descontinuidade no tratamento. As razões que levaram ao insucesso terapêutico foram a toxicidade dos fármacos (34% no grupo de doentes sob terapia com TMP-SMZ e 25% no grupo sob terapia com pentamidina) e a ausência de resposta ao fármaco (42% no grupo do TMP-SMZ e 40% no grupo da pentamidina) [Caumes *et al.* 1994; Barry & Johnson 2001]. No entanto, deve-se referir que os dados investigados neste estudo são relativos a um período, em que os casos mais severos de PPc não eram tratados com auxílio de corticosteróides.

O uso de corticosteróides como tratamento adjuvante para a PPc tem demonstrado um efeito de redução nas reacções de hipersensibilidade ao TMP-SMZ, e mesmo, de aumento da acção deste fármaco nos casos de hipoxemia [Masur 1992a].

A lise de *P. jirovecii* pela acção do tratamento etiológico agrava a resposta inflamatória, exacerbando-a. Os corticosteróides inibem a inflamação ao diminuírem o afluxo de células mononucleares, reduzindo dessa forma a fibrose pulmonar [Bozzette *et al.* 1990; Bozzette & Morton 1995]. Actualmente, é recomendado que nos doentes com formas graves de PPc ( $\text{PaO}_2$  inferior a 70 mmHg ou com valor do gradiente de oxigénio artério-alveolar menor que 35 mmHg) deve ser administrada corticoterapia logo no início do tratamento etiológico [Bozzette *et al.* 1990; Moe & Hardy 1994; Benson *et al.* 2004; Matos *et al.* 2008], com o propósito de:

- 1) Diminuir os efeitos adversos dos fármacos, em especial do TMP-SMZ;
- 2) Prevenir ou reduzir a hipoxemia;
- 3) Melhorar o prognóstico.

Nos doentes refractários ou intolerantes à terapêutica com TMP-SMZ ou pentamidina, o combate à infecção pode ser feito com recurso à acção antiparasitária de fármacos alternativos de segunda linha. A dapsona é uma sulfa que inibe a síntese de folatos ao bloquear a acção da DHPS, a clindamicina actua a nível dos ribossomas afectando a síntese proteica, enquanto que para a primaquina, não está estabelecido um mecanismo de acção, embora se pense que actue inibindo o transporte de electrões na mitocôndria. Assim, as combinações dapsona-TMP e primaquina-clindamicina podem ser utilizadas no tratamento de PPc com gravidade ligeira a moderada [Masur 1992b; Safrin *et al.* 1996; Toma *et al.* 1998]. A atovaquona é uma hidroxinaftoquinona que inibe o transporte de electrões no complexo citocromo bc1, da membrana mitocondrial. Este fármaco também pode ser utilizado na terapêutica de casos de PPc com gravidade ligeira a moderada, embora estudos tenham demonstrado uma eficácia menor em relação ao TMP-SMZ e à pentamidina [Hughes *et al.* 1993; Dohn *et al.* 1994; Hughes 1995b]. Outros fármacos, como a combinação trimetrexato-leucovorina (actuante sobre a via biossintética do ácido fólico) ou a eflornitina (inibidor da ornitina descarboxilase, enzima chave na síntese das poliaminas), também demonstram efeitos anti-*P. jirovecii*, podendo ser utilizados na terapêutica da pneumocistose, como recurso, caso os fármacos, acima mencionados, não tenham tido sucesso [Smith *et al.* 1990; Amsden *et al.* 1992; Sattler *et al.* 1994]. Mais recentemente, algumas lipoproteínas antifúngicas têm vindo a ser estudadas como alternativas terapêuticas para a PPc. A caspofungina, a

anidulafungina e a micofungina, da família das equinocandinas, são candidatas promissoras a agentes anti-*P. jirovecii*. Estudos indicam que estas moléculas actuam na parede celular dos fungos, bloqueando a síntese de  $\beta$ -1,3-glucano (inexistente nas células animais), por inibição não-competitiva da  $\beta$ -1,3-glucano sintetase, sendo activas, apenas, contra a forma quística de *Pneumocystis* (rica em  $\beta$ -1,3-glucano) [Lorand & Kocsis 2007].

**Quadro II.** Alvos metabólicos dos principais fármacos utilizados no tratamento da pneumocistose.

Fármaco	Alvo molecular	Suspeita de resistência	Tipo de pneumocistose	Terapêutica	Profilaxia
TMP-SMZ	DHPS/DHFR	Mutações no gene <i>DHPS</i>	Ligeira a severa	Primeira linha	Primeira linha
Pentamidina	tRNA	Suspeita de resistência clínica	Ligeira a severa	Segunda linha	Raro
Primaquina-clindamicina	Síntese proteica e cadeia respiratória	Sem evidências	Ligeira a moderada	Segunda linha	Sem aplicação
Atovaquona	Citocromo <i>b</i>	Mutações no local de ligação da co-enzima Q	Ligeira a moderada	Alternativa de segunda linha	Alternativa de segunda linha
Dapsona-TMP	DHPS/DHFR	Mutações no gene <i>DHPS</i>	Ligeira a moderada	Alternativa de segunda linha	Alternativa de segunda linha



## **SEGUNDA PARTE**

**Potencial implicação de múltiplos marcadores polimórficos de  
*Pneumocystis jirovecii* na apresentação e evolução clínica da PPc.**





## 10. Relação entre polimorfismos de *Pneumocystis jirovecii* e parâmetros clínicos da PPc

### 10.1. O problema e o método

*P. jirovecii* é um importante agente infeccioso, causador de pneumonia em doentes com infecção VIH/sida, tendo sido, também, já descritos casos de infecção em pessoas imunocompetentes ou com graus moderados de imunodeficiência [Peterson & Cushion 2005; Medrano *et al.* 2005; Matos *et al.* 2006; Thomas, Jr. & Limper 2007; Hauser *et al.* 2009]. Nos últimos anos, foram conseguidos progressos significativos na profilaxia, no tratamento e no diagnóstico da PPc. Contudo, a pneumocistose, permanece como um problema clínico importante, sendo uma das principais infecções oportunistas que afectam os doentes seropositivos para VIH [Barry & Johnson 2001; Walzer *et al.* 2008]. A inexistência de um processo sustentado de cultivo de *P. jirovecii* é uma importante limitação nas várias áreas de estudo da PPc [Stringer 1996; Wakefield 2002; Beck & Cushion 2009]. Apesar da recente aplicação de técnicas de biologia molecular no estudo de *P. jirovecii*, até à presente data, as tentativas de associar genótipos específicos do microrganismo com a informação clínica da infecção, têm apresentado resultados escassos e muitas vezes infrutíferos. Poucos foram os estudos conclusivos, onde se conseguiram associar polimorfismos específicos a factores da infecção por *P. jirovecii* [Armstrong *et al.* 2000; Hauser *et al.* 2001a; Hauser *et al.* 2001b; Huang *et al.* 2006]. Permanecem por esclarecer as razões pelas quais alguns doentes sofrem de graus moderados de pneumocistose, com resposta favorável aos fármacos anti-*P. jirovecii*, enquanto outros sofrem de pneumocistose severa que pode revelar-se fatal, apesar da terapia [Helweg-Larsen *et al.* 1999; Barry & Johnson 2001; Hauser *et al.* 2001b; Matos *et al.* 2003b]. Se, por um lado, alguns estudos apontam para que determinados indicadores de prognóstico clínico possam estar relacionados com a evolução da infecção, por outro, os avanços no conhecimento da diversidade genética de *P. jirovecii* têm demonstrado que polimorfismos específicos podem determinar o perfil epidemiológico do microrganismo, como a sua distribuição geográfica, a resistência a fármacos, a virulência de alguns subtipos, os modos de transmissão e a genética da população [Helweg-Larsen *et al.* 1999; Miller & Wakefield 1999; Beard *et al.* 2000; Armstrong *et al.* 2000; Morris *et al.* 2004; Crothers *et al.* 2005; Thomas, Jr. & Limper

2007; Miller *et al.* 2007; Radhi *et al.* 2008; Walzer *et al.* 2008]. Tendo por base estes dados, coloca-se a hipótese de que factores, como a virulência ou a resistência a fármacos, características apresentadas por determinados subtipos genéticos de *P. jirovecii*, possam estar, de alguma forma, dependentes de múltiplos genótipos e, portanto, da associação de polimorfismos múltiplos que ocorrem em diversas regiões do genoma do microrganismo. As diferentes associações de polimorfismos, ou haplótipos, poderão conferir ao microrganismo características distintas, influenciando a apresentação e a evolução clínica dos casos de PPC, aos quais dão origem.

A descoberta de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) em múltiplos genes de *P. jirovecii* abriu as portas para os estudos de associação genética, onde se tenta determinar a existência de haplótipos característicos e a sua importância na apresentação e na evolução da doença. Porém, as técnicas implementadas para a genotipagem de isolados de *P. jirovecii* apresentam algumas limitações para este tipo de abordagem, pois, de um modo geral, são metodologias morosas, dispendiosas e limitadas relativamente ao número de amostras e de regiões genómicas a estudar [Olsson *et al.* 1998; Hauser *et al.* 2001a; Hauser *et al.* 2001b; Costa *et al.* 2006b; Esteves *et al.* 2008; Matos & Esteves 2010b]. A recente evolução nas metodologias de caracterização genética, veio possibilitar o aumento do rendimento e a diminuição dos custos de operação, permitindo análises de associação genética mais amplas e sensíveis [Kim & Misra 2007]. Desta forma, o presente projecto de investigação, submetido e aprovado pelos conselhos de ética das instituições envolvidas, teve como propósito a identificação e classificação de SNPs de *P. jirovecii* e a aplicação de tecnologia de alta capacidade, que permite relacionar, de forma célere e robusta, as características genéticas de um elevado número de isolados de *P. jirovecii* com os parâmetros clínicos da infecção, em grupos específicos de doentes, provenientes de uma determinada população.

Com o objectivo de identificar regiões genómicas, potencialmente associadas com parâmetros da infecção por *P. jirovecii*, foi proposto um passo inicial que consistiu numa pesquisa bibliográfica abrangente, a qual teve como finalidade a avaliação do interesse relativo dos *loci*, considerando a sua variabilidade, importância metabólica, e a possível relação com a resistência a fármacos, factores de virulência, propriedades de superfície do microrganismo e diferentes graus de severidade da infecção. A diversidade

genética, as frequências de distribuição de genótipos e a relação entre os genótipos observados e diversos parâmetros da infecção, foram investigadas, numa primeira fase, para cada gene individual, aplicando as técnicas de PCR, sequenciação directa e análise de fragmentos de restrição (RFLP do inglês *restriction fragment length polymorphism*). Após esta abordagem inicial, que permitiu a identificação dos SNPs de *P. jirovecii*, aparentemente, associados a parâmetros clínicos específicos, prosseguiu-se o estudo, desenvolvendo e optimizando metodologias de alto rendimento, com o propósito de classificar os SNPs, permitindo a exclusão de SNPs considerados não relevantes, ou, conseguindo, por exemplo, classificá-los e relacioná-los com graus de maior gravidade da doença. As metodologias de genotipagem, baseadas na associação das técnicas de PCR *multiplex* e de genotipagem por polimerização de base única (SBE, do inglês *single base extension*), com capacidade de processar grandes quantidades de amostras, de forma altamente sensível e precisa, possibilitaram a identificação simultânea de vários *loci* polimórficos, demonstrando potencial para fornecer um grande volume de informação, que pode ser utilizado na caracterização de múltiplas regiões genómicas de *P. jirovecii* [Hirschhorn *et al.* 2000; Markoulatos *et al.* 2002; Faber *et al.* 2005].

A associação e o encadeamento das técnicas de PCR *multiplex*/SBE, em conjunto com a inovadora técnica de agrupamento de múltiplas amostras de DNA, também designada por DNA *pooling*, permitiu a caracterização genética de *P. jirovecii* através do estudo de múltiplos *loci* independentes, num alargado número de amostras, de forma dinâmica e robusta. A associação destas metodologias, teve como objectivo, por um lado, a identificação de genes polimórficos associados à virulência e à resistência a fármacos e, por outro lado, o estabelecimento de haplótipos, que de alguma forma, poderão estar implicados na gravidade da infecção por *P. jirovecii* [Sham *et al.* 2002; Le Hellard *et al.* 2002; Kim & Misra 2007].

## 10.2. Objectivos gerais

Com o presente estudo, pretendeu-se obter informação acerca da variabilidade genética de *P. jirovecii* e da sua associação com determinadas características clínicas, como, por exemplo, os diferentes graus de severidade da infecção, provocados por determinados subtipos de microrganismos, usando, para isso, as metodologias de imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM), PCR, PCR

seguido de sequenciação directa, PCR seguido de RFLP, RT-PCR, PCR *multiplex* seguido de SBE e DNA *pooling*. O trabalho envolveu a recolha de espécimes pulmonares de doentes com co-infecção VIH/*P. jirovecii*, com e sem quadro clínico compatível com PPC, e de doentes seronegativos para VIH, infectados por *P. jirovecii*. Estas amostras foram estudadas para a pesquisa de polimorfismos de genes envolvidos em fenómenos de resistência a fármacos ou associados com diversos graus de severidade da doença, previamente descritos na literatura e, também, para a selecção de novos genes candidatos. Para os polimorfismos seleccionados, como potencialmente relevantes, procedeu-se a uma análise individual das amostras, com o intuito de encontrar diferenças significativas entre os grupos analisados (ex. casos com evolução clínica favorável *versus* casos com evolução clínica desfavorável, ou casos com cargas parasitárias elevadas *versus* casos com cargas parasitárias baixas).

Após a identificação dos polimorfismos potencialmente relevantes, pretendeu-se aplicar, desenvolver e implementar metodologias de elevada capacidade, como a PCR *multiplex*/SBE em associação com DNA *pooling*, para haplotipagem de *P. jirovecii* em amostras clínicas. A aplicação conjunta destas metodologias teve como objectivo acelerar a identificação dos polimorfismos de *P. jirovecii* com impacto a nível clínico, permitindo uma aproximação baseada em haplótipos para a caracterização clínica deste microrganismo patogénico. Assim, com haplótipos devidamente identificados, os quais poderão estar relacionados com determinados parâmetros da infecção por *P. jirovecii*, o derradeiro objectivo da presente investigação, foi a aplicação do conhecimento gerado no auxílio ao diagnóstico e à escolha adequada do tratamento, permitindo um melhor controlo da doença.

## **11. Avaliação da diversidade genética de *Pneumocystis jirovecii*: selecção de alvos moleculares**

### **11.1. Diversidade intra-específica de *Pneumocystis jirovecii***

Devido à dificuldade em obter grandes quantidades de organismos de *P. jirovecii* para caracterização genética, não existe, até à data, nenhum mapa genómico deste microrganismo. No entanto, no início da década de 90, do século passado, a técnica de electroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês *pulsed-field gel electrophoresis*), que permite separação de fragmentos de DNA de grandes dimensões, começou a ser utilizada em estudos genéticos de *Pneumocystis*. A aplicação desta técnica permitiu determinar a dimensão do genoma nuclear de *Pneumocystis*, isolado de rato, em cerca de oito milhões de pares de bases (Mb) de DNA, encontrando-se dividido entre 15 a 18 cromossomas, cada um deles com 700 a 1000 kilobases (Kb) de DNA. Vários genes, de *Pneumocystis* isolado de rato, foram clonados e sequenciados, demonstrando que o DNA do microrganismo é rico em adenina e timina (60 a 65%) [Worley *et al.* 1989; Cushion *et al.* 1993; Stringer 1994; Wyder *et al.* 1998]. Num estudo de 1998, a dimensão do genoma de *Pneumocystis*, isolado de humanos, foi quantificada em 7.7 Mb, apresentando um perfil electroforético de 13 bandas com pesos moleculares compreendidos entre os 370 e os 810 Kb [Stringer & Cushion 1998].

A aplicação de técnicas de biologia molecular na caracterização genética de *Pneumocystis*, veio levantar a questão de que, para além da divergência entre *Pneumocystis* isolados de diferentes espécies de hospedeiros, poderão também existir variações genéticas entre *Pneumocystis* isolados de um mesmo hospedeiro, como é o caso de *P. jirovecii*. Ocorrendo de uma forma menos extensa do que a divergência observada entre *Pneumocystis* isolados de diferentes espécies de hospedeiros, a divergência genética entre *Pneumocystis* isolados de hospedeiros da mesma espécie, é comum e frequentemente observada. Esta diversidade poderá conduzir à existência de organismos com características distintas, dentro dos diferentes géneros de *Pneumocystis* [Stringer & Walzer 1996; Stringer 2002; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002].

A heterogeneidade genética de organismos de *Pneumocystis* isolados a partir da mesma espécie de hospedeiro foi, pela primeira vez, observada no início dos anos 90 do século passado, através da técnica de PFGE em *Pneumocystis* de rato. Foi verificado

que, quando submetidos a uma corrida electroforética de campo pulsado em gel de agarose, os cromossomas de *Pneumocystis*, isolados de diferentes ratos, migram de forma diferencial. Estas diferenças nos perfis electroforéticos têm, no caso deste hospedeiro, duas origens prováveis. Assim, a primeira variação de perfil electroforético, onde se observam diferentes números de bandas em alguns dos isolados, indica a presença de duas espécies distintas de *Pneumocystis* que infectam os ratos (*P. carinii* f. sp. *carinii* e *P. carinii* f. sp. *rattus*). A segunda variação de perfil electroforético, em que o número de bandas é igual entre os isolados, mas onde algumas das bandas migram de forma diferencial, indica variação genética entre organismos de *P. carinii* f. sp. *carinii*, a espécie mais comum entre os ratos de laboratório. Assim, nestes estudos, diferentes perfis electroforéticos de *P. carinii* f. sp. *carinii* foram identificados. Estas observações apontam, muito provavelmente, para a existência de múltiplos subtipos, ou mesmo de estirpes deste organismo [Hong *et al.* 1990; Cushion *et al.* 1993]. Paralelamente, *P. jirovecii* foi também investigado no decorrer de um desses estudos. Diferentes perfis electroforéticos foram detectados para *P. jirovecii*. No entanto, a visualização de bandas, através deste tipo de técnica, é bastante difícil e limitado em amostras pulmonares humanas, facto inerente ao número reduzido de organismos disponível neste tipo de amostras biológicas. Mais recentemente, a divergência genética de *P. jirovecii* tem vindo a ser demonstrada, através de técnicas moleculares, que envolvem a amplificação prévia de porções de DNA do microrganismo, como é o caso da PCR [Cushion *et al.* 1993; Stringer 1996].

Diversos estudos, realizados com base nessa metodologia, demonstraram que sequências polimórficas de DNA são detectadas frequentemente em isolados de *P. jirovecii*, sugerindo que a variação genética é comum neste microrganismo e que diversos subtipos genéticos podem existir. Numa primeira abordagem, na década de 90, do século passado, uma análise à sequência nucleotídica do gene que codifica para a subunidade grande do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*), demonstrou a presença de substituições pontuais em três posições nucleotídicas [Sinclair *et al.* 1991; Lee *et al.* 1993]. A partir dessa altura, diversas regiões genómicas têm sido utilizadas no estudo da epidemiologia molecular da pneumocistose. A genotipagem dos espaçadores transcriptos internos 1 e 2 (*ITS1* e *ITS2*, do inglês *internal transcribed spacers*), localizados no gene nuclear de cópia única que codifica para o rRNA citoplasmático,

demonstrou forte variabilidade genética destas regiões, o que implica um método altamente discriminatório, em especial na caracterização geográfica de clones de *P. jirovecii*. As regiões *ITS* são consideradas altamente variáveis entre os subtipos do microrganismo, sofrendo variações mais rapidamente do que os domínios funcionais que as flanqueiam. De acordo com a nomenclatura de Lee *et al.* 1998, pelo menos 60 combinações genótípicas diferentes, de entre um total de 240, teoricamente possíveis, foram já descritas para as regiões *ITS* de *P. jirovecii*. [Lu *et al.* 1994; Lee *et al.* 1998; Nimri *et al.* 2002; Matos *et al.* 2003b; Esteves *et al.* 2008]. Considerando a caracterização de isolados de *P. jirovecii*, numa abordagem multilocus, a utilização das regiões *ITS* promove um aumento considerável do número de genótipos, o que reduz a utilidade deste tipo de método, especialmente quando se pretende avaliar potenciais correlações entre genótipos específicos e parâmetros clínicos da infecção, ou quando se pretendem aplicar determinados estudos populacionais ou evolutivos. Estudos demonstraram a ausência de correlação entre os genótipos destas regiões, altamente variáveis, e os parâmetros clínicos da infecção por *P. jirovecii*, bem como a sua inutilidade como marcadores genéticos em estudos evolutivos [Helweg-Larsen *et al.* 2001; Hauser *et al.* 2001a; Miller *et al.* 2003a; Valerio *et al.* 2007; van Hal *et al.* 2009]. Nos estudos mais recentes, efectuados às regiões *ITS* de *P. jirovecii* isolados na população portuguesa, foi determinada a prevalência de um genótipo *ITS* específico (Eg), que pode variar entre os 29 e os 48% [Costa 2006; Costa *et al.* 2006b; Esteves *et al.* 2008]. Estes resultados foram concordantes com estudos anteriores, também realizados em *P. jirovecii* isolado na população portuguesa, onde Eg foi o genótipo predominante, com uma frequência de 23% [Matos *et al.* 2003b]. Diversos estudos efectuados um pouco por todo o globo, em especial, na Europa e nos E.U.A., demonstraram que alguns genótipos, em particular o Eg, apresentam uma distribuição geográfica e temporal ubíqua, sendo detectados em isolados de *P. jirovecii* de diversos países e em anos variados [Tsolaki *et al.* 1998; Helweg-Larsen *et al.* 2001; Nimri *et al.* 2002; Esteves *et al.* 2008].

A maioria dos estudos de variabilidade genética de *P. jirovecii* aplica a análise de genotipagem a apenas um *locus*. A detecção de variação nucleotídica num gene de *P. jirovecii* pode indicar a existência de subtipos genéticos estáveis, mas também, pode indicar a instabilidade dessa porção de DNA e a acção de forças de selecção, que podem



estar a actuar sobre essa região. Porém, alguns estudos multilocus realizados, confirmaram a variabilidade genética de *P. jirovecii* em diversos *loci*, de forma consistente com a existência de subtipos genéticos estáveis [Banerji *et al.* 1995; Keely *et al.* 1995; Keely & Stringer 1997; Wakefield 1998; Hauser *et al.* 1998; Stringer 2002].

### **11.2. Introdução à epidemiologia molecular de *Pneumocystis jirovecii***

A tipagem genética tornou-se nos últimos 20 anos uma das principais ferramentas do estudo epidemiológico da PPc [Goesch *et al.* 1990; Wakefield 1996; Casanova-Cardiel & Leibowitz 1997; Bartlett *et al.* 1997; Lundgren *et al.* 1997; Latouche *et al.* 1997a; Olsson *et al.* 1998; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Miller & Wakefield 1999; Beard *et al.* 2000; Stringer 2002; Montes-Cano *et al.* 2004; Chabe *et al.* 2004; Costa *et al.* 2005; Crothers *et al.* 2005; Hocker *et al.* 2005; Matos *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2008; Matos & Esteves 2010b]. As técnicas moleculares desenvolvidas permitem:

- 1) O estudo da biodiversidade, inter e intra-específica de *P. jirovecii*;
- 2) A identificação de reservatórios ambientais e de potenciais fontes de infecção;
- 3) A identificação dos modos de transmissão e da dinâmica da transmissão;
- 4) O estudo da variabilidade genética em isolados de *P. jirovecii* de doentes de uma mesma população;
- 5) O reconhecimento de casos de colonização e de portadores assintomáticos;
- 6) A caracterização da distribuição geográfica de determinados marcadores moleculares;
- 7) A identificação de potenciais mecanismos de resistência a fármacos;
- 8) O reconhecimento de prováveis marcadores moleculares de virulência.

A principal metodologia para investigar a ocorrência de variações genéticas entre organismos de *P. jirovecii* e a existência de potenciais subtipos, consiste no estudo molecular de sequências nucleotídicas de *loci* específicos, a partir de amostras biológicas, entendendo-se por amostra biológica, material biológico específico recolhido a um indivíduo, num determinado momento, para detecção de organismos de *P. jirovecii*. A diversidade alélica de *P. jirovecii* tem sido estudada com recurso a técnicas de genotipagem, tais como, sequenciação directa após amplificação de DNA, análise de polimorfismos por RFLP, análise de polimorfismos por conformação de

DNA em cadeia simples (SSCP, do inglês *single strand conformation polymorphism*) e análise de sequências por hibridação com sondas de oligonucleótidos específicas [Lu *et al.* 1995; Beard *et al.* 2000; Ma & Kovacs 2001; Hauser *et al.* 2001a; Wakefield *et al.* 2003; Costa *et al.* 2006b; Esteves *et al.* 2008].

Nos últimos anos, diversas regiões polimórficas foram identificadas, estudadas e caracterizadas (quadro III). Entre essas regiões, encontram-se:

- 1) Os genes das subunidades grande e pequena do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA* e *mtSSU rRNA*);
- 2) O gene mitocondrial do citocromo *b* (*CYB*);
- 3) Os genes nucleares de rRNA (*5.8S rRNA*, *26S rRNA* e *18S rRNA*);
- 4) Os espaçadores transcritos internos 1 e 2 (*ITS1* e *ITS2*) do rRNA nuclear;
- 5) O gene da superóxido dismutase (*SOD*);
- 6) Os genes que codificam para a  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina ( $\alpha$  *TUB* e  $\beta$  *TUB*);
- 7) O gene da tiorredoxina reductase (*TRR1*);
- 8) O gene da timidilato sintetase (*TS*);
- 9) O gene da enzima pentafuncional *arom*;
- 10) O gene da proteína quinase *cdc2*;
- 11) Os genes das enzimas da via metabólica do ácido fólico, dihidrofolato reductase (*DHFR*) e dihidropteroato sintetase (*DHPS*);
- 12) Os genes da família das glicoproteínas major de superfície MSG e da região conservada UCS, do inglês *upstream conserved region*;
- 13) O gene da protease *kexin-like* (*KEX1*).

**Quadro III.** Características genéticas e genes de *P. jirovecii* com as correspondentes referências bibliográficas, nas quais foram publicados pela primeira vez.

Característica genética	Referência
Dimensão do genoma (7.7 Mb)	[Stringer & Cushion 1998]
Perfil electroforético (13 bandas)	[Stringer & Cushion 1998]
<i>mtLSU rRNA</i>	[Wakefield <i>et al.</i> 1992]
<i>mtSSU rRNA</i>	[Hunter & Wakefield 1996]
<i>CYB</i>	[Walker <i>et al.</i> 1998]
<i>rRNA</i> nuclear	[Liu <i>et al.</i> 1992]
Regiões <i>ITS</i>	[Lu <i>et al.</i> 1994]
<i>SOD</i>	[Denis <i>et al.</i> 2000]
$\alpha$ <i>TUB</i>	[Stringer <i>et al.</i> 1993a]
$\beta$ <i>TUB</i>	[Edlind <i>et al.</i> 1992]
<i>TRR1</i>	[Kutty <i>et al.</i> 2003]
<i>TS</i>	[Mazars <i>et al.</i> 1995]
<i>arom</i>	[Banerji <i>et al.</i> 1995]
<i>cdc2</i>	[Kaiser <i>et al.</i> 1999]
<i>DHFR</i>	[Ma <i>et al.</i> 1999]
<i>DHPS</i>	[Ma <i>et al.</i> 1999]
<i>MSG</i>	[Garbe & Stringer 1994]
<i>UCS</i>	[Wada & Nakamura 1996]
<i>KEX1</i>	[Kutty & Kovacs 2003]

### 11.3. Diversidade genética dos alvos moleculares seleccionados

Com a intenção de identificar genes potencialmente associados com factores da infecção por *P. jirovecii*, tais como, a resistência a fármacos ou a virulência, efectuou-se o estudo da variabilidade genética de isolados de *P. jirovecii* em Portugal. Até à data, não existe uma base de dados que contenha a sequência do genoma de *P. jirovecii*. Devido à escassez de informação sobre os determinantes genéticos, os genes candidatos, considerados no presente estudo, foram previamente seleccionados com base numa extensa pesquisa bibliográfica, a qual permitiu verificar a importância dos *loci*, a existência de informação prévia sobre as sequências e suas características, e a potencialidade para estas sequências poderem estar, de alguma forma, relacionadas com factores e parâmetros da infecção, resistência a fármacos, factores de virulência e

propriedades de superfície do microrganismo. As regiões genómicas incluídas no presente estudo foram divididas em:

- 1) Genes mitocondriais (*mtLSU rRNA* e *CYB*);
- 2) Genes nucleares (genes funcionais tais como *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *TRR1* e *TS*);
- 3) Genes potencialmente implicados em fenómenos de resistência aos fármacos da família das sulfas (*DHFR* e *DHPS*);
- 4) Genes relacionados com propriedades de superfície (região *UCS* das MSGs e *KEX1*).

### 11.3.1. Genes mitocondriais

O gene multicópia *mtLSU rRNA* está implicado em funções metabólicas básicas da célula de *P. jirovecii*, mais concretamente na função dos ribossomas mitocondriais, encontrando-se entre os alvos preferenciais para a sequenciação e identificação de organismos de *P. jirovecii* [Wakefield *et al.* 1990a; Tsolaki *et al.* 1998; Beard *et al.* 2000]. Este *locus* tem vindo a ser usado, consistentemente, na caracterização de isolados de *P. jirovecii*, sendo considerado um importante marcador molecular no estudo da distribuição geográfica de genótipos de *P. jirovecii*. Trata-se da região de DNA de eleição para a detecção do parasita, por técnicas moleculares, mais concretamente por PCR, sendo um gene que, teoricamente, se encontra sob pouca, ou mesmo, nenhuma pressão selectiva, servindo, presumivelmente, como indicador de alterações genéticas fenotipicamente neutras [Wakefield *et al.* 1990a; Wakefield *et al.* 1990b; Lee *et al.* 1993; Wakefield *et al.* 1994; Tsolaki *et al.* 1998; Beard *et al.* 2000; Stringer 2002]. Os SNPs identificados para este gene encontram-se descritos no quadro IV.

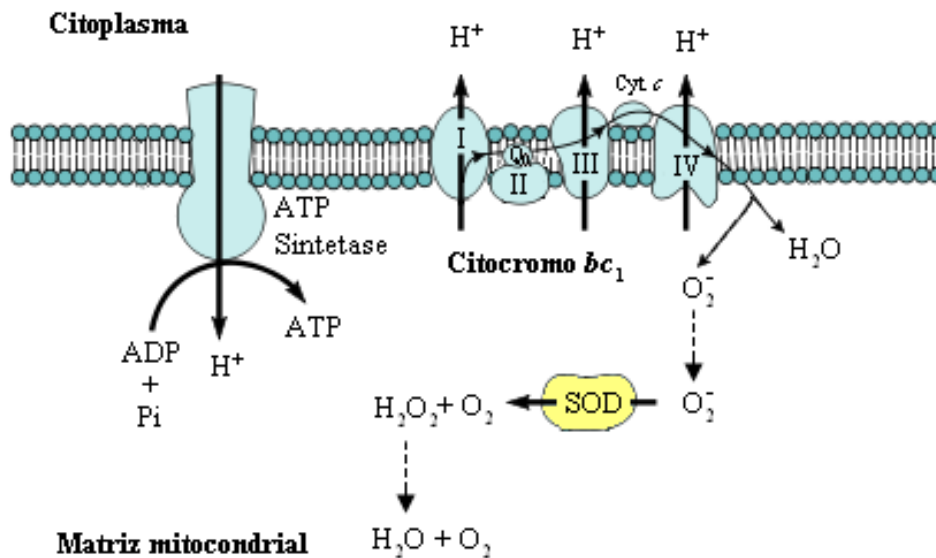
O citocromo *b* é a principal subunidade do complexo transmembranar citocromo *bc*<sub>1</sub>, desempenhando uma função essencial no transporte de electrões da cadeia respiratória que ocorre na mitocôndria (figura 13). Alguns polimorfismos foram já descritos para o gene *CYB* de *P. jirovecii* (quadro V), com especial relevância para mutações que podem ocorrer na região Q<sub>0</sub>, um local de ligação da ubiquinona (CoQ, de coenzima Q), uma molécula lipofílica da membrana interna da mitocôndria, responsável pelo transporte de electrões dos complexos I e II para o complexo III (citocromo *bc*<sub>1</sub>), durante a respiração celular [Cushion *et al.* 2000; Meshnick *et al.* 2001].

**Quadro IV.** Variações nucleotídicas descritas para o gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*. A cada um dos SNPs indicados, corresponde a referência bibliográfica, onde a sequência nucleotídica foi publicada pela primeira vez.

SNP	Nucleótido (posição : identidade)	Referência
<i>mt34</i>	34 : G	[Sinclair <i>et al.</i> 1991]
	34 : A	[Lee <i>et al.</i> 1993]
<i>mt85</i>	85 : C	[Sinclair <i>et al.</i> 1991]
	85 : T	[Lee <i>et al.</i> 1993]
	85 : A	[Wakefield <i>et al.</i> 1992]
<i>mt181</i>	181 : A	[Sinclair <i>et al.</i> 1991]
	181 : G	[Lee <i>et al.</i> 1993]
<i>mt248</i>	248 : C	[Sinclair <i>et al.</i> 1991]
	248 : T	[Lee <i>et al.</i> 1993]
<i>mt288</i>	288 : G	[Sinclair <i>et al.</i> 1991]
	288 : A	[Lee <i>et al.</i> 1993]

A resistência à atovaquona, um composto lipofílico análogo da ubiquinona, que inibe o transporte de electrões ao nível do citocromo *bc*<sub>1</sub>, provocando o colapso do potencial electrónico da membrana mitocondrial, foi já descrita para outros microrganismos, como *Plasmodium* e *Toxoplasma*. Nesses microrganismos, a resistência parece estar correlacionada com mutações do gene do citocromo *b* que resultam em alterações da cadeia de aminoácidos nos locais de ligação à CoQ. Pensa-se que estas alterações podem alterar a afinidade de ligação do citocromo *b* à CoQ [Srivastava *et al.* 1999; McFadden *et al.* 2000]. Trabalhos de investigação publicados, a partir do final da década de 90, do século passado, demonstraram a existência de polimorfismos sinónimos e não sinónimos na sequência do gene *CYB* de *P. jirovecii*. Os autores de um desses estudos verificaram que mutações do citocromo *b* são significativamente mais comuns em doentes, com co-infecção VIH/*P. jirovecii*, expostos à atovaquona. Esses estudos indicam que estas mutações poderão estar associadas a isolados obtidos de doentes que se encontram a receber profilaxia anti-*P. jirovecii* com atovaquona [Walker *et al.* 1998; Kazanjian *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2002b].

No entanto, o significado clínico desta associação permanece por explicar. Devido à diversidade genética apresentada por este *locus*, no presente trabalho, pretendeu-se analisar a ocorrência de SNPs, no gene *CYB* de *P. jirovecii*, isolado de elementos de uma população não exposta à atovaquona.



**Figura 13.** Representação esquemática da cadeia respiratória, que ocorre na membrana mitocondrial, e da acção de detoxificação da superóxido dismutase dependente de manganésio, no interior do organelo. O citocromo *bc*<sub>1</sub>, dividido em três complexos (I, II e III), interage com a CoQ na região Q<sub>0</sub>. No final da cadeia respiratória (IV), o citocromo *c* é oxidado, pela citocromo *c* oxidase, sendo, o oxigénio molecular, o receptor final de electrões. Quando há formação de iões superóxido, a enzima SOD actua, sintetizando oxigénio e peróxido de hidrogénio.

**Quadro V.** Variações nucleotídicas identificadas para o gene que codifica para o citocromo *b* de *P. jirovecii*. A cada um dos SNPs indicados, corresponde a referência bibliográfica, onde a sequência foi publicada pela primeira vez. Todos os SNPs descritos para a sequência *CYB* localizam-se no exão do gene.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Referência
<i>CYB279</i>	279 (93) : C (Ile)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	279 (93) : T (Ile)	
<i>CYB299</i>	299 (100) : C (Thr)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	299 (100) : T (Ile)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB348</i>	348 (116) : A (Gly)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	348 (116) : G (Gly)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB358</i>	358 (120) : A (Ile)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	358 (120) : G (Val)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB362</i>	362 (121) : C (Thr)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	362 (121) : T (Ile)	
<i>CYB369</i>	369 (123) : G (Leu)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	369 (123) : T (Phe)	
<i>CYB373</i>	373 (125) : T (Ser)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	373 (125) : G (Ala)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB516</i>	516 (172) : C (Ile)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	516 (172) : T (Ile)	
<i>CYB518</i>	518 (173) : C (Ser)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	518 (173) : T (Phe)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB547</i>	547 (183) : C (Leu)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	547 (183) : T (Leu)	[Takahashi <i>et al.</i> 2002b]
<i>CYB716</i>	716 (239) : C (Pro)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	716 (239) : T (Leu)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB742</i>	742 (248) : C (Leu)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	742 (248) : T (Phe)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB832/CYB833</i>	832/833 (278) : T/T (Leu)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	832/833 (278) : G/G (Gly)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB838</i>	838 (280) : C (Leu)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	838 (280) : T (Phe)	[Kazanjian <i>et al.</i> 2001]
<i>CYB1032</i>	1032 (344) : T (Gly)	[Walker <i>et al.</i> 1998]
	1032 (344) : A (Gly)	

### 11.3.2. Genes nucleares

Como parasita do epitélio pulmonar, *P. jirovecii* localiza-se no microambiente alveolar, estando constantemente exposto à pressão oxidativa exercida pela acção dos macrófagos e neutrófilos alveolares. Por outro lado, moléculas reactivas derivadas do oxigénio podem ser produzidas, como resultado da redução electrónica de oxigénio molecular, pelo processo de fosforilação oxidativa, durante a síntese de ATP, na mitocôndria. As espécies reactivas de oxigénio são uma potencial fonte de danos na célula do microrganismo, podendo afectar estruturas susceptíveis, tais como, o material genético, componentes membranares, proteínas e enzimas. As superóxido dismutases (SOD) são enzimas ubíquas, que protegem as células contra os radicais livres de oxigénio, ao catalizarem a reacção do primeiro passo de destoxificação, que consiste na transformação do anião superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio (figura 13). São conhecidas três grandes classes de enzimas SOD, classificadas de acordo com o metal que funciona como cofactor no centro activo enzimático. Estudos indicam que o gene *SOD* de *P. jirovecii* codifica para uma superóxido dismutase dependente de manganésio, uma enzima com localização mitocondrial [Pesanti 1984; Denis *et al.* 1998]. Trata-se de um gene nuclear de cópia única, que dá origem a uma enzima que migra para a mitocôndria do microrganismo. Após a síntese no citoplasma, a enzima é transportada para a mitocôndria através de um péptido de sinalização específico. Aparentemente, a enzima é estritamente necessária para a destoxificação dos compostos reactivos de oxigénio, derivados da cadeia de respiração redox, que ocorre na mitocôndria, e do stress oxidativo, imposto pelo ambiente pulmonar, podendo constituir um factor de protecção celular, mas também, um importante factor de patogenicidade [Denis *et al.* 1998; Denis *et al.* 2000]. A diversidade genética do *locus SOD* de *P. jirovecii* foi já demonstrada em estudos anteriores, onde diversos polimorfismos foram detectados (quadro VI), revelando a importância deste gene para os estudos de genotipagem e de biodiversidade do microrganismo [Wakefield *et al.* 2003; Miller *et al.* 2003a; Miller *et al.* 2005b].

Os microtúbulos são formados por dímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina, desempenhando importantes funções como componentes de estruturas celulares basais, tais como o citosqueleto, ou como componentes de estruturas de locomoção celular, como os cílios e os flagelos. Os microtúbulos estão implicados em diversos aspectos do transporte



intracelular e, também, na divisão celular, pois são dos componentes principais dos fusos acromáticos que se formam durante a mitose e a meiose. Estudos indicam que o gene de *P. jirovecii* que codifica para a  $\beta$ -tubulina tem localização nuclear, ocorrendo como cópia única neste organismo. Foram já descritos diversos polimorfismos no gene  $\beta$  TUB, demonstrando a sua utilidade em estudos de genotipagem de isolados de *P. jirovecii* [Edlind *et al.* 1992; Hauser *et al.* 1997a; Nahimana *et al.* 2000; Volpe *et al.* 2001]. Apesar da sequência nucleotídica da  $\beta$ -tubulina ser relativamente conservada, o estudo da sua heterogeneidade pode fornecer importantes dados epidemiológicos. Os SNPs descritos para este gene encontram-se resumidos no quadro VII.

**Quadro VI.** SNPs descritos para o gene de *P. jirovecii*, que codifica para a superóxido dismutase dependente de manganésio. Todas as variações nucleotídicas detectadas no gene *SOD* foram previamente descritas por Denis *et al.* 2000.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)
<i>SOD110</i>	110 Intrão 2 : C
	110 Intrão 2 : T
<i>SOD179</i>	179 (29) Exão 3 : A (Ala)
	179 (29) Exão 3 : T (Ala)
<i>SOD215</i>	215 (41) Exão 3 : T (Asp)
	215 (41) Exão 3 : C (Asp)

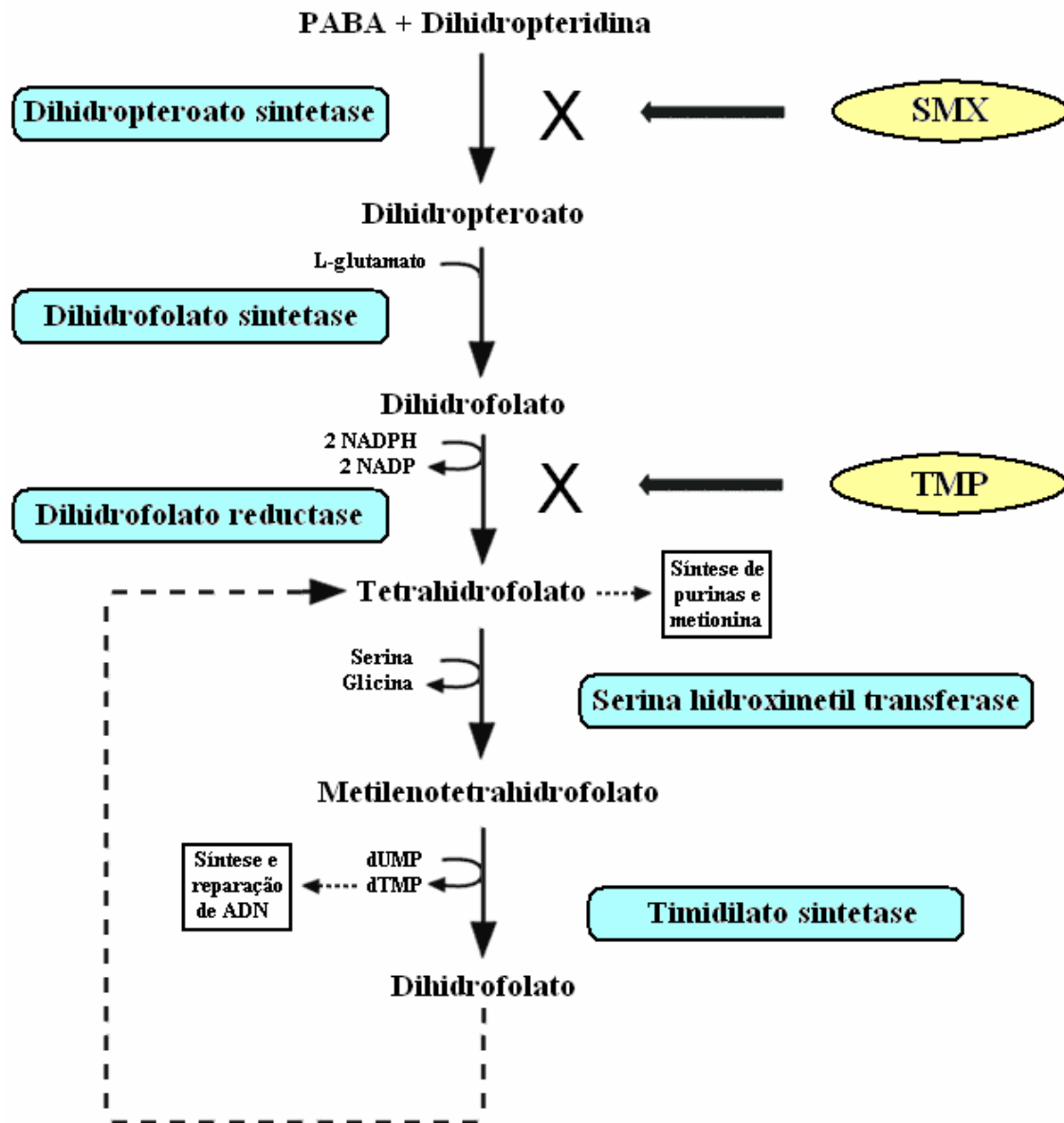
**Quadro VII.** Variações nucleotídicas descritas para o gene de *P. jirovecii* que codifica para a  $\beta$ -tubulina. A cada um dos SNPs indicados, corresponde a referência bibliográfica, onde a sequência nucleotídica foi publicada pela primeira vez.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Referência
$\beta$ TUB24	24 (8) Exão 3 : A (Ala)	[Edlind <i>et al.</i> 1992]
	24 (8) Exão 3 : T (Ala)	[Hauser <i>et al.</i> 1997a]
$\beta$ TUB96	96 (32) Exão 3 : G (Val)	[Edlind <i>et al.</i> 1992]
	96 (32) Exão 3 : A (Val)	[Volpe <i>et al.</i> 2001]
$\beta$ TUB282	282 (93) Exão 4 : G (Leu)	[Edlind <i>et al.</i> 1992]
	282 (93) Exão 4 : A (Leu)	[Hauser <i>et al.</i> 1997a]

A tioredoxina reductase (TRR) é uma enzima citolítica dimérica que catalisa a redução de tioredoxina, utilizando NADPH, como cofactor. A tioredoxina, na sua forma reduzida, é uma importante molécula dadora de electrões em diversas reacções bioquímicas da célula, que incluem sinalização redox, resposta a pressão oxidativa e redução de ligações dissulfido. Esta enzima está implicada no crescimento celular (activação de factores de transcrição e síntese de DNA) e na patogenicidade de alguns microrganismos [Arner & Holmgren 2000; Kutty *et al.* 2003]. No início do presente século, os autores de um estudo, onde se caracterizou o gene que codifica para a protease *kexin-like* de *P. jirovecii*, localizaram o gene da tioredoxina reductase imediatamente a jusante da sequência *KEX1*. Tal como o que sucede para o gene *KEX1* de *P. jirovecii*, o *TRR1* é um gene de cópia única no genoma do organismo que infecta os humanos. Existem dois tipos de tioredoxinas reductases, as de elevado peso molecular (frequentes em animais e protozoários como *Plasmodium*), que comportam dois centros activos redox, e as de baixo peso molecular (frequentes em plantas, bactérias e fungos), que apenas possuem um centro activo redox, no domínio NADPH, composto por dois resíduos de cisteína separados por outros dois resíduos aminoacídicos. A tioredoxina reductase codificada por *P. jirovecii* é de baixo peso molecular, com um centro activo redox CAVC (duas cisteínas separadas por uma alanina e uma valina) localizado no domínio NADPH [Kutty *et al.* 2003]. Até à data, nenhum polimorfismo foi detectado no gene *TRR1* de *P. jirovecii*, existindo apenas a descrição das sequências nucleotídica e aminoacídica, efectuada por Kutty *et al.* 2003. No entanto, devido à sua importância, este gene apresenta-se como um alvo interessante para o estudo de diversidade em isolados de *P. jirovecii*.

A timidilato sintetase (TS) é uma enzima determinante no ciclo celular, sendo responsável pela síntese *de novo* de desoxitimidina monofosfato (dTMP), molécula essencial para os mecanismos de síntese e de reparação de DNA. Esta enzima cataliza a metilação reductiva de desoxiuridina monofosfato (dUMP) em dTMP, com a formação de dihidrofolato, molécula intermédia da síntese do ácido fólico (figura 14) [Edman *et al.* 1989b; Anderson *et al.* 2000]. Sabe-se que, nos protozoários (ex. *Leishmania* e *Plasmodium*), a TS e a DHFR constituem uma cadeia peptídica única, codificada no mesmo cromossoma. Nessa proteína bifuncional, os dois respectivos domínios encontram-se separados por um péptido de junção. Num estudo, que decorreu no final

da década de 80 do século passado, onde o gene da timidilato sintetase de *Pneumocystis* foi isolado e a sua expressão foi estudada, verificou-se que, neste microrganismo, a TS e a DHFR não se encontram ligadas, e que o gene *TS* está presente no genoma de *Pneumocystis* como uma cópia única. Estudos de clonagem, sequenciação e expressão da TS e da DHFR de *P. jirovecii* confirmaram que ambas as enzimas são monofuncionais e que os genes que as codificam se localizam em diferentes cromossomas [Edman *et al.* 1989a; Edman *et al.* 1989b; Ivanetich & Santi 1990; Mazars *et al.* 1995]. Assim, o gene *TS* codifica para uma enzima constitutiva (*housekeeping*), essencial para a viabilidade celular, sendo considerada uma região conservada. Estudos indicam diversos polimorfismos nas sequências nucleotídicas dos genes *TS* isolados de diferentes espécies de hospedeiros. Este *locus* foi também utilizado em estudos moleculares de genotipagem e biodiversidade de *P. jirovecii*, sem que até à data tenham sido descritos polimorfismos. Por se tratar de um gene que codifica para uma enzima chave das vias metabólica dos precursores de DNA e de ácido fólico, a sua caracterização parece ser um importante factor no estudo de isolados de *P. jirovecii* [Edman *et al.* 1989b; Mazars *et al.* 1995; Latouche *et al.* 1997a].



**Figura 14.** Representação esquemática da via biossintética do ácido fólico e da acção de inibição do sulfametoxazol (SMZ) e do trimetoprim (TMP). PABA ; ácido *para*-aminobenzóico.

### 11.3.3. Genes implicados em fenómenos de resistência aos fármacos da família das sulfas

O ácido fólico é um precursor essencial da síntese *de novo* de purinas (adenina e guanina), timidina, glicina e metionina. Ao contrário do hospedeiro vertebrado, *P. jirovecii* não tem a capacidade de obter ácido fólico a partir do exterior da célula,

sendo absolutamente dependente do seu próprio mecanismo de síntese para obter esta molécula [Kovacs *et al.* 1989a; Armstrong *et al.* 2000]. A DHFR e a DHPS são enzimas da via metabólica do ácido fólico, alvos da acção das diaminopirimidinas e dos fármacos da família das sulfas, como é exemplo, a combinação sinérgica de fármacos TMP-SMZ, considerado o fármaco anti-*P. jirovecii* de primeira linha. Enquanto o TMP actua como inibidor competitivo, interferindo com a acção da DHFR e impossibilitando a síntese de tetrahydrofolato, o SMZ tem como alvo a DHPS, actuando como falso substrato para a enzima (inibidor competitivo), análogo do ácido para-aminobenzóico (PABA), inibindo a síntese de dihydropteroato. Deste modo, a inibição da DHFR e da DHPS, conduz a célula de *P. jirovecii* ao colapso, por falta de bases nucleotídicas necessárias para a reparação, replicação e transcrição de DNA, e por restrição de aminoácidos para a síntese proteica [Ma *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2000]. O uso generalizado de TMP-SMZ, quer na profilaxia, quer no tratamento anti-*P. jirovecii*, durante as últimas três décadas, conduziu a algumas questões relevantes, acerca do desenvolvimento de resistência por parte de *P. jirovecii* ao TMP-SMZ, pois, estão descritos relatos de ocorrência de PPc em doentes sob profilaxia anti-*P. jirovecii*. O uso alargado do fármaco implica a exposição de doentes ao TMP-SMZ, com especial relevância para os seropositivos para VIH, submetidos a profilaxia anti-*P. jirovecii*, podendo este facto estar associado, muito provavelmente, com o desenvolvimento de resistências ao TMP-SMZ, descritas, também, para outros microrganismos [Lane *et al.* 1997; Martin *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000; Armstrong *et al.* 2000; Costa 2006].

A DHFR ao converter dihydrofolato em tetrahydrofolato, durante a via biossintética do ácido fólico (figura 14), promove não só a síntese de purinas, mas também interfere na formação de outras moléculas com importantes funções celulares, como alguns aminoácidos [Schnell *et al.* 2004]. É reconhecido que mutações pontuais detectadas no gene *DHFR* são responsáveis por um importante mecanismo de resistência, em diversos microrganismos [Ma *et al.* 1999; Huang *et al.* 2004]. Recentemente, alguns estudos têm analisado a variabilidade genética do gene *DHFR* de *P. jirovecii*, avaliando a sua contribuição para o desenvolvimento de resistências ao TMP. Nesses estudos, foi identificado um total de 31 SNPs, dos quais oito correspondem a polimorfismos sinónimos e 23 a polimorfismos não sinónimos.

No quadro VIII, encontram-se as variações genéticas descritas para o gene *DHFR* de *P. jirovecii*, em Portugal [Ma *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2002b; Nahimana *et al.* 2004; Robberts *et al.* 2005; Costa *et al.* 2006a]. Até ao momento, a associação entre a exposição ao TMP-SMZ e o aumento da frequência de mutações no gene *DHFR* de *P. jirovecii* permanece por clarificar [Costa 2006].

**Quadro VIII.** Variações nucleotídicas, detectadas em Portugal, para o gene *DHFR* de *P. jirovecii*. A cada um dos SNPs indicados, corresponde a referência bibliográfica, onde a sequência foi publicada pela primeira vez.

SNP*	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Referência
<i>DHFR38</i>	38 (13) Exão 1 : T (Leu)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	38 (13) Exão 1 : C (Ser)	[Costa <i>et al.</i> 2006a]
<i>DHFR68</i>	68 (23) Exão 1 : A (Asn)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	68 (23) Exão 1 : G (Ser)	[Costa <i>et al.</i> 2006a]
<i>DHFR92</i>	92 (31) Exão 1 : C (Ser)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	92 (31) Exão 1 : T (Phe)	[Costa <i>et al.</i> 2006a]
<i>DHFR154</i>	154 (52) Exão 1 : A (Met)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	154 (52) Exão 1 : T (Leu)	[Costa <i>et al.</i> 2006a]
<i>DHFR200</i>	200 (67) Exão 1 : C (Ala)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	200 (67) Exão 1 : T (Val)	[Takahashi <i>et al.</i> 2002a]
<i>DHFR201</i>	201 (67) Exão 1 : T (Ala)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	201 (67) Exão 1 : A (Ala)	[Costa <i>et al.</i> 2006a]
<i>DHFR272</i>	272 Intrão 1 : T	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	272 Intrão 1 : C	[Costa <i>et al.</i> 2006a]
<i>DHFR312</i>	312 (117) Exão 2 : T (Gly)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	312 (117) Exão 2 : C (Gly)	
<i>DHFR381</i>	381 (140) Exão 2 : C (Ser)	[Ma <i>et al.</i> 1999]
	381 (140) Exão 2 : T (Ser)	[Costa <i>et al.</i> 2006a]

\* Para além das variações genéticas descritas para o gene *DHFR* em Portugal, são também conhecidos, para este *loci*, polimorfismos sinónimos nas posições 36, 277, 278 e 540, e polimorfismos não sinónimos nas posições 40, 77, 107, 110, 156, 175, 188, 194, 235, 358, 422, 472, 500, 514, 539, 550, 553 e 632 [Ma *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2002b; Nahimana *et al.* 2004; Robberts *et al.* 2005].

O gene *DHPS* de *P. jirovecii* tem vindo a ser estudado por investigadores de todo o Mundo no decorrer dos últimos anos. Este interesse deve-se à ocorrência de mutações no gene *DHPS* que podem, eventualmente, ser uma consequência da exposição às sulfas, por parte do microrganismo. Alguns destes estudos demonstraram que mutações específicas neste gene estão associadas ao insucesso da profilaxia com sulfas, em doentes com sida que desenvolveram PPc. Esta ineficácia profilática poderá indicar que estas mutações estão, de alguma forma, relacionadas com a emergência de estirpes de *P. jirovecii* resistentes à acção desta família de fármacos [Kazanjian *et al.* 1998; Mei *et al.* 1998; Ma *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2000; Kazanjian *et al.* 2000; Costa *et al.* 2003]. Em meados da década de 90, do século passado, o gene *DHPS* de *P. jirovecii* foi sequenciado e caracterizado, verificando-se que faz parte de uma sequência única que codifica para uma proteína trifuncional, responsável pela síntese de ácido fólico (figura 14), a FAS do inglês *folic acid synthesis*, composta pela DHPS, a dihidroneopterin aldolase e a hidroximetildihidropterina pirofosfocinase. No decorrer dessa década, estudos moleculares permitiram a identificação de seis polimorfismos em zonas conservadas do gene *DHPS*, mais concretamente nos codões 23, 55, 57, 60, 111, 171 e 248. [Volpe *et al.* 1993; Lane *et al.* 1997; Ma *et al.* 1999; Matos & Esteves 2010a]. Recentemente, foram acrescentadas mais cinco variações nucleotídicas à lista de polimorfismos do gene *DHPS* de *P. jirovecii*, nos codões 75, 78, 83, 87 e 100 [Robberts *et al.* 2005; Riebold *et al.* 2006; Matos & Esteves 2010a]. Com a excepção dos polimorfismos sinónimos dos codões 83 e 171, todas as alterações correspondem a polimorfismos não sinónimos que conduzem a mutações na proteína. Diversos estudos foram realizados com o intuito de averiguar a relação entre mutações no gene *DHPS* e casos de insucesso terapêutico ou profilático. Os resultados de alguns desses estudos indicam uma potencial associação entre génotipos com mutações simples ou duplas, identificadas nos codões 55 e 57 do gene *DHPS*, e a exposição às sulfas, bem como a resistência profilática ao TMP-SMZ, sugerindo que estas mutações poderão implicar a redução da sensibilidade de *P. jirovecii* às sulfas. Os resíduos aminoácidos 55 e 57 estão localizados numa região altamente conservada da enzima, muito semelhante entre diversos microrganismos, e que se pensa estar envolvida na ligação ao substrato (dihidropteridina) e às sulfas. Mutações nestes locais, ou nas suas proximidades, podem estar implicadas no rearranjo estrutural da enzima, afectando a sua actividade

[Kazanjian *et al.* 1998; Mei *et al.* 1998; Ma *et al.* 1999; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2000; Armstrong *et al.* 2000; Costa *et al.* 2005; Matos & Esteves 2010a]. Por estas razões, as mutações dos codões 55 e 57 são as variações mais estudadas da sequência do gene *DHPS*. Estas substituições pontuais, não sinónimas, permitem a identificação de diferentes genótipos de *P. jirovecii*, conforme o tipo de polimorfismo detectado (quadro IX).

**Quadro IX.** Variações nucleotídicas mais estudadas no gene *DHPS* de *P. jirovecii*. As variações nucleotídicas dos codões 55 e 57 foram descritas por Lane *et al.* 1997.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)
<i>DHPS165</i>	165 (55) : A (Thr)
	165 (55) : G (Ala)
<i>DHPS171</i>	171 (57) : C (Pro)
	171 (57) : T (Ser)

Todas estas variações sugerem que o uso generalizado da combinação TMP-SMZ poderá estar a causar pressão selectiva sobre os genótipos de *P. jirovecii* que circulam nos hospedeiros humanos. Apesar de não estarem completamente esclarecidos os efeitos de determinados polimorfismos nos genes *DHFR* e *DHPS* na apresentação e, em especial, na evolução clínica, da pneumocistose, estes genes nucleares de cópia única devem ser sempre considerados nos estudos que tenham como objectivo clarificar as causas do potencial desenvolvimento de resistência ao TMP-SMZ, em *P. jirovecii*.

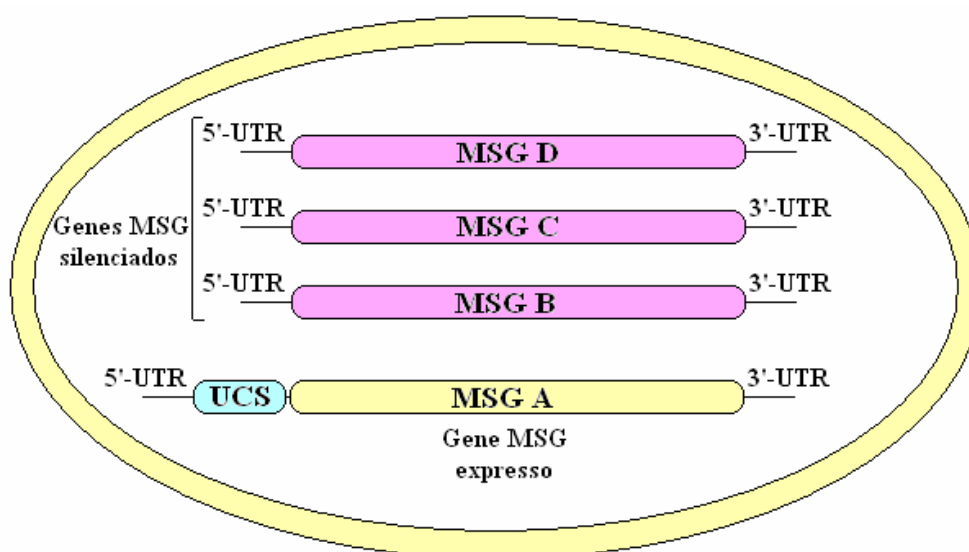
#### 11.3.4. Genes relacionados com propriedades de superfície

As regiões subteloméricas dos cromossomas de muitos organismos contêm famílias de genes específicos que permitem, sob determinadas condições, adaptação ao ambiente envolvente, e, também, adaptação a alterações que ocorrem nesse mesmo ambiente. Em muitos parasitas, estas famílias de genes subteloméricos codificam para proteínas responsáveis pela variação antigénica. Estudos indicam que o genoma de *Pneumocystis* contém uma família importante de sequências múltiplas, que se repetem dezenas de vezes nas regiões subteloméricas dos cromossomas, e que codificam para as glicoproteínas major de superfície (MSG) [Stringer & Keely 2001; Esteves *et al.* 2009].



As MSGs são as principais proteínas de superfície de *P. jirovecii*. Estas glicoproteínas intervêm na aderência do parasita aos pneumócitos do lúmen alveolar e, ao mesmo tempo, permitem que o microrganismo desenvolva um processo evasivo ao sistema de defesa do hospedeiro, através de um mecanismo de variação antigénica de superfície. Codificadas por uma família de genes, com aproximadamente 100 membros, organizados em *clusters* de três ou mais genes dispostos em série, a sua expressão aparenta ser regulada de modo a que ocorram rearranjos genéticos programados. À vez, e de forma individual, diferentes genes de MSG são colocados e retirados de um único local do genoma pelo qual o RNA mensageiro (mRNA) das MSGs é transcrito. Com esta constatação, compreendeu-se que a variação na expressão de MSGs é mediada por uma região conservada, a qual foi denominada de *UCS* [Wada & Nakamura 1996; Sunkin & Stringer 1996; Sunkin *et al.* 1998; Stringer 2007; Kutty *et al.* 2008]. A *UCS* encerra em si uma sequência comum a todas as MSGs expressas. O local de expressão das MSGs engloba a região comum *UCS* e uma outra região próxima, a jusante, responsável pela parte variável desta família de genes. O modelo proposto para o controlo da expressão da família de genes das MSGs consiste na organização em *clusters* transcricionais silenciados, localizados nos terminais cromossómicos. Apenas é transcrito o gene MSG localizado a jusante do *locus UCS*, pelo que somente uma isoforma de MSG é expressa à superfície (figura 15). Por haver, apenas, um *locus UCS*, pensa-se que a MSG de superfície é alterada, quando o gene MSG é trocado nessa região. A troca de MSG (*switching*) resulta numa variedade de MSGs na superfície de microrganismos em diferentes populações, como, também, numa mesma população, incrementando uma forte diferenciação antigénica de superfície [Sunkin *et al.* 1998; Kutty *et al.* 2001].

A capacidade de *P. jirovecii* em expressar diferentes proteínas de superfície pode estar na génese da resistência e/ou escapatória ao sistema imunológico do hospedeiro, ficando evidente que à superfície, as MSGs estão, profundamente, envolvidas quer no reconhecimento, quer na ligação ao hospedeiro [Stringer & Keely 2001; Esteves *et al.* 2009]. A região *UCS* contém sequências de repetição características e alguns polimorfismos, que podem ser úteis na genotipagem de isolados de *P. jirovecii*, tal como está descrito nos quadros X e XI.



**Figura 15.** Representação esquemática do modelo de expressão das glicoproteínas de superfície (MSGs) de *P. jirovecii*. Os genes *MSG* encontram-se nos terminais cromossômicos e apenas um é transcrito. À superfície do organismo é expressa a isoforma codificada pelo gene *MSG* localizado a montante da região conservada de expressão (*UCS*). Através de um fenómeno de recombinação, ocorre mudança do gene no local de expressão, implicando alteração da *MSG* transcrita e do antígeno de superfície. UTR; do inglês *untranslated region*.

**Quadro X.** Descrição das sequências de repetição localizadas no intrão da região *UCS* de *P. jirovecii*. Os três tipos diferentes de sequências de repetição, localizadas no intrão da região conservada *UCS*, foram descritos por Kutty, *et al.* 2001. Estas sequências de repetição, de 10 nucleótidos, diferenciam-se por alterações na primeira e na quarta base, podendo ser detectadas em diferentes números (entre duas e seis repetições) [Kutty *et al.* 2001; Ma *et al.* 2002].

Tipo de sequência de repetição*	Sequências nucleotídicas
Tipo1	ACAGGCGCAT
Tipo2	ACATGCGCAT
Tipo3	GCAGGCGCAT

**Quadro XI.** Variações nucleotídicas descritas para a sequência conservada *UCS*, localizada nas regiões subteloméricas de *P. jirovecii*. A cada um dos SNPs, corresponde a referência bibliográfica, onde a sequência foi publicada pela primeira vez. Todos os SNPs descritos para a região *UCS* localizam-se no intrão do gene. Dois situam-se a jusante das sequências de repetição (*UCS1501* e *UCS1533*), enquanto que os outros dois localizam-se a montante dessas sequências (*UCS1624* e *UCS1696*).

SNP*	Nucleótido (posição : identidade)	Referência
<i>UCS1501</i>	1501 : C	[Kutty <i>et al.</i> 2001]
	1501 : T	
<i>UCS1533</i>	1533 : A	[Kutty <i>et al.</i> 2001]
	1533 : G	[Ma <i>et al.</i> 2002]
<i>UCS1624</i>	1624 : G	[Kutty <i>et al.</i> 2001]
	1624 : A	[Ma <i>et al.</i> 2002]
<i>UCS1696</i>	1696 : G	[Kutty <i>et al.</i> 2001]
	1696 : A	[Ma <i>et al.</i> 2002]

O gene que codifica para a protease *kexin-like* de *P. jirovecii* localiza-se a montante do gene *TRR1*, e corresponde a uma sequência de cópia única no genoma do microrganismo. Ao contrário do que acontece para *P. jirovecii*, em *Pneumocystis* de rato, foram detectadas múltiplas cópias de um gene equivalente ao *KEX1*, o gene da protease de superfície *PRT1* [Kutty & Kovacs 2003]. A protease *KEX1* apresenta domínios típicos de endoprotease, tais como, um péptido sinal, um prodomínio, um domínio catalítico endoproteolítico, um domínio P, uma região rica em serina/treonina e um domínio transmembranar. Estudos indicam que na terminação carboxílica da *KEX1* existe um domínio transmembranar hidrofóbico, seguido por uma região intracitoplasmática hidrofílica, características de proteases expressas no complexo de Golgi. Pensa-se que esta protease esteja envolvida no processamento proteolítico pós-tradução das MSGs, removendo a região conservada *UCS* (péptido sinal das MSGs) antes da expressão das MSG na superfície de *P. jirovecii*. Deste modo, a *KEX1* influencia a variabilidade dos antígenos de superfície do patógeno, ao intervir directamente na maturação das principais glicoproteínas de superfície. Esta enzima desempenha uma função de processamento e maturação de proteínas, mantendo a

integridade da superfície celular, de forma homóloga às endoproteases de alguns fungos [Lee *et al.* 2000; Kutty & Kovacs 2003; Esteves *et al.* 2009]. Até à presente data, nenhum polimorfismo foi detectado no gene *KEX1* de *P. jirovecii*, existindo apenas a descrição das sequências nucleotídica e aminoacídica, efectuada por Kutty & Kovacs 2003. Porém, por causa da sua importância biológica, este gene é um alvo interessante para o estudo de diversidade de *P. jirovecii*.

#### 11.4. Material e métodos

A pesquisa bibliográfica efectuada permitiu a compilação de informação sobre as sequências dos *loci* de interesse, a sua importância a nível metabólico, e a potencialidade para estas regiões genómicas poderem estar, de alguma forma, relacionadas com parâmetros da infecção por *P. jirovecii*. Para a identificação, caracterização e selecção dos genes de interesse, procedeu-se à:

- 1) Definição dos critérios de inclusão das amostras;
- 2) Caracterização da população em estudo;
- 3) Processamento das amostras;
- 4) Diagnóstico parasitológico;
- 5) Extração do DNA de *P. jirovecii* das amostras;
- 6) Diagnóstico molecular de *P. jirovecii*;
- 7) Amplificação e sequenciação das regiões genómicas de interesse;
- 8) Análise e compilação dos dados clínicos recolhidos;
- 9) Respectiva integração dos resultados.

Com este processo, pretendeu-se identificar os polimorfismos de *P. jirovecii* com relevância para o estudo, relacionando-se os SNPs detectados com os dados clínicos obtidos.

Com a intenção de identificar genes potencialmente associados com factores da infecção por *P. jirovecii*, tais como, a resistência a fármacos ou a virulência, efectuou-se o estudo da variabilidade genética de isolados de *P. jirovecii* em Portugal. Até à data, não existe uma base de dados que contenha a sequência do genoma de *P. jirovecii*. Devido à escassez de informação sobre os determinantes genéticos, os genes candidatos, considerados no presente estudo, foram previamente seleccionados com base numa extensa pesquisa bibliográfica, a qual permitiu verificar a importância dos *loci*, a existência de informação prévia sobre as sequências e suas características, e a potencialidade para estas sequências poderem estar, de algum modo, relacionadas com factores e parâmetros da infecção, resistência a fármacos, factores de virulência e propriedades de superfície do microrganismo.

Após extensa pesquisa bibliográfica, as regiões genómicas incluídas no presente estudo foram divididas em:

- 1) Genes mitocondriais (*mtLSU rRNA* e *CYB*);
- 2) Genes nucleares (genes funcionais tais como *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *TRR1* e *TS*);
- 3) Genes potencialmente implicados em fenómenos de resistência às sulfas (*DHFR* e *DHPS*);
- 4) Genes relacionados com propriedades de superfície (região *UCS* das MSGs e *KEX1*).

#### 11.4.1. Critérios de inclusão

Com base na informação clínica obtida, definiram-se os critérios de classificação dos casos clínicos, que se dividiram nos seguintes grupos:

- 1) Grupo A, doentes seropositivos para VIH com PPc confirmada laboratorialmente e com quadro clínico compatível (casos confirmados de PPc);
- 2) Grupo B, doentes seropositivos para VIH com PPc confirmada laboratorialmente, mas sem quadro clínico compatível (casos com apresentação clínica atípica de PPc);
- 3) Grupo C, doentes seropositivos para VIH com infecção assintomática por *P. jirovecii* (casos de colonização subclínica).

Definição de caso de PPc. Um episódio de infecção por *P. jirovecii* foi definido como um caso com quadro clínico sugestivo de pneumocistose, com *P. jirovecii* identificado por técnicas parasitológicas, como a IFI/AcM, ou, pela detecção do DNA de *P. jirovecii*, por PCR *nested*, nos espécimes pulmonares. Entende-se por apresentação clínica compatível com PPc um conjunto de sintomas, tais como, tosse não produtiva, febre e dispneia, radiograma do tórax com imagem com infiltrado intersticial bilateral e pressão parcial do oxigénio (PaO<sub>2</sub>) no sangue periférico inferior a 65 mmHg.

Apresentação atípica de PPc. Corresponde a um episódio, durante o qual, se detecta *P. jirovecii* por IFI/AcM e/ou por PCR *nested*, em doentes com quadro clínico atípico.

Infecção subclínica ou portador assintomático de *P. jirovecii*. Caso com reduzida carga parasitária, onde *P. jirovecii* é identificado, apenas, por PCR *nested*, nos espécimes pulmonares, sem o suporte do diagnóstico clínico de PPc.

#### **11.4.2. População estudada**

Para o estudo dos polimorfismos nas regiões genómicas seleccionadas, a população escolhida, caracteriza-se por ser constituída por um grupo definido de doentes adultos, seropositivos para VIH, com sintomatologia respiratória, provenientes de dois hospitais da cidade de Lisboa. Das amostras de secreções pulmonares submetidas para diagnóstico de PPc na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, entre 2001 e 2007, foram escolhidas, de forma aleatória, 102 secreções pulmonares que respeitavam os critérios de inclusão. Desta forma, foram analisadas, 102 secreções pulmonares, recolhidas a 96 doentes, entre Janeiro de 2001 e Dezembro de 2007, devidamente acompanhadas da respectiva informação clínica. As 102 amostras, estudadas nesta fase de identificação, caracterização e selecção de SNPs nos genes de *P. jirovecii*, considerados de interesse, dividiram-se em 38 expectorações induzidas (EI) e 64 lavados broncoalveolares (LBA). Todas as amostras foram testadas e consideradas positivas para *P. jirovecii* através do diagnóstico parasitológico e/ou molecular. Em seis dos 96 adultos seropositivos para VIH, foram recolhidas duas amostras durante o episódio de PPc. A média de idades dos doentes foi de 40 anos e a mediana foi de 37 anos, num intervalo de idades de 24 a 69 anos.

#### **11.4.3. Processamento das amostras de secreções pulmonares**

O presente estudo compreendeu amostras de secreções pulmonares enviadas para o laboratório da Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, para o diagnóstico da pneumocistose. Ao chegarem ao laboratório, as amostras de secreções pulmonares (EI e LBA) (*vide* Anexo I) [Matos 1999; Matos *et al.* 2006], foram identificadas e processadas de imediato, o material biológico foi concentrado e dividido para procedimentos de diagnóstico e para posteriores estudos moleculares. O protocolo de processamento, para os dois tipos de amostra, encontra-se descrito abaixo:

Expectoração Induzida (EI). Num passo inicial, adiciona-se, à amostra, igual volume de ditiotreitol (0,1%). Este é um agente químico mucolítico que é adicionado à amostra com o objectivo de solver e solubilizar as partículas e agregados de muco. Agita-se vigorosamente, até que a mistura se encontre bem homogeneizada. Coloca-se a mistura na estufa durante 30 minutos a 37°C, para que o ditiotreitol actue. A amostra liquefeita é transferida para um tubo de centrifuga, adiciona-se tampão fosfato salino (PBS do inglês *phosphate buffered saline*), 150 mM, com pH 7,2 (SIGMA), até preencher o volume do tubo, levando-se a centrifugar a 4100 g, durante 20 minutos. O PBS comporta-se como um tampão estabilizante e a centrifugação serve para concentrar as células de *P. jirovecii* que ficam no sedimento. O sedimento é composto por uma grande variedade de células e de detritos que existem naturalmente neste tipo de produtos biológicos, para além de *P. jirovecii*. O sobrenadante é rejeitado, seguindo-se a ressuspensão do sedimento em 0,5 ml de PBS. Fazem-se cinco esfregaços, com aproximadamente 50 µl de amostra cada, em lâminas de microscopia pré-tratadas com poli-L-lisina (*vide* Anexo II). Deixa-se secar, à temperatura ambiente (no interior de “hotte”), dividindo-se o restante volume da amostra para microtubos de 1,5 ml. Quando secos, os esfregaços são fixados em acetona, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

Lavado broncoalveolar (LBA). Este protocolo é bastante semelhante ao apresentado para as amostras de EI, no entanto, como as amostras de LBA, normalmente, não aparentam muco, inicia-se o processamento transferindo a amostra directamente para um tubo de centrifuga, perfazendo-se o volume do tubo com PBS e centrifugando-se a mistura (4100 g). A partir deste ponto, o procedimento é igual ao indicado para as amostras de EI.

No final de ambos os procedimentos, uma das cinco lâminas de microscopia com o esfregaço (material biológico concentrado) é usada para efectuar a técnica de IFI/AcM e as restantes são conservadas a -20°C, para posterior estudo ou para confirmação de algum resultado, caso seja necessário. Os tubos contendo a amostra concentrada são armazenados a -80°C, de modo a conservar intacto todo o material biológico.



#### 11.4.4. Diagnóstico parasitológico de *Pneumocystis jirovecii*

Nesta secção pretende-se descrever o procedimento para a avaliação microbiológica e molecular de *P. jirovecii*, em amostras de secreções pulmonares. A técnica de detecção de *P. jirovecii* por IFI/AcM é considerada como a referência para o diagnóstico da pneumocistose, em amostras de secreções pulmonares, pois, é bastante fiável e sensível na detecção de quistos de *P. jirovecii* [Baughman *et al.* 1989; Lautenschlager *et al.* 1996; Bava *et al.* 2002]. Esta técnica consiste na identificação de organismos de *P. jirovecii* pelos seus antígenos de superfície, utilizando AcM específicos. Para o efeito, foi utilizado um protocolo comercial (MonoFluo<sup>®</sup> Kit *P. jirovecii*, BioRad) e a técnica foi executada com base nas instruções do fabricante:

**1) Digestão enzimática:** Inicialmente, a enzima é reconstituída com 250 µl de ácido clorídrico (HCl) 0,001 M. Numa lâmina de microscopia, com esfregaço da amostra, fixado com acetona, colocam-se 20 µl de enzima diluída (1:10 com tampão específico fornecido pelo fabricante) directamente sobre o esfregaço, espalhando-se suavemente. Coloca-se a lâmina em câmara húmida na estufa, a 37°C e aguardam-se 30 minutos, considerando-se, este período de tempo, como o ideal para que a enzima actue sobre a camada mais exposta da parede celular dos quistos de *P. jirovecii* de forma a expor, preponderantemente, os antígenos de superfície. A enzima referida, é a tripsina que pertence à família das proteases séricas, que catalisam a hidrólise de proteínas nas ligações peptídicas internas entre diferentes tipos de aminoácidos. Esta protease vai actuar sobre as proteínas de superfície, permitindo que os antígenos específicos fiquem mais expostos e por isso mais acessíveis aos anticorpos. A incubação deve demorar os 30 minutos indicados pelo fabricante, para que não ocorra sobredigestão ou subdigestão das paredes quísticas.

**2) Reacção com o AcM:** Logo após a incubação, a lâmina é lavada, cuidadosamente, com água desionizada. Sobre o esfregaço bem seco, aplicam-se 20 µl da solução de AcM específico. O esfregaço, com o AcM anti-*P. jirovecii* vai a incubar em câmara húmida, a 37°C, durante 15 minutos. Este AcM, produzido e purificados a partir de ratos, é específico para os antígenos presentes na parede dos quistos de *P. jirovecii*.

**3) Reacção com o conjugado com fluoresceína:** Passados os 15 minutos, lava-se a lâmina com água destilada, secando-se em seguida. Depositam-se 20 µl de solução de conjugado com isotiocianato de fluoresceína sobre o esfregaço, seguindo-se incubação em câmara húmida durante 15 minutos, a 37°C. Este conjugado consiste num anti-anticorpo (IgM) conjugado com isotiocianato de fluoresceína, o qual vai reagir e, consequentemente, ligar-se ao anticorpo que já se encontra conectado aos antígenos de superfície da parede dos quistos de *P. jirovecii*. A fluoresceína, quando exposta a uma luz de comprimento de onda de 475 nm emite fluorescência de cor verde limão característica.

**4) Observação por microscopia de fluorescência:** Por fim, monta-se a preparação com o meio de montagem fornecido (glicerina tamponada), ficando esta pronta para ser observada ao microscópio óptico de fluorescência no comprimento de onda de 475 nm. Um esfregaço é considerado positivo quando aparenta quistos ovais ou arredondados com cerca de 4-5 µm de diâmetro, com cor verde limão característica (figura 12.B). Um teste contendo mais do que um quisto fluorescente é considerado positivo e um teste que contenha apenas um quisto é considerado inconclusivo, devendo ser repetido.

Para além do diagnóstico parasitário, a técnica de IFI/AcM foi aplicada na quantificação das cargas parasitárias das amostras em estudo. Assim, a carga parasitária de cada um dos isolados de *P. jirovecii*, foi estimada por contagem do número de quistos observados nos esfregaços efectuados, a partir das secreções pulmonares, tal como o descrito no quadro XII.

**Quadro XII.** Critério para a determinação da carga parasitária dos isolados de *P. jirovecii*, englobados no presente estudo.

Carga Parasitária	N.º de quistos de <i>P. jirovecii</i> detectados por IFI/AcM (X1000)
Baixa*	Nenhum quisto identificado em 30 campos (positivo por PCR)
Moderada	Um a 30 quistos detectados em 30 campos
Elevada	Dois ou mais quistos detectados num campo

\*Amostras de secreções pulmonares, negativas por IFI/AcM, mas positivas para *P. jirovecii* por detecção molecular (PCR *nested*).

#### 11.4.5. Extracção de DNA

O DNA genómico de *P. jirovecii* foi extraído, recorrendo-se ao método do Mini Beadbeater/tiocianato de guanidina-sílica, uma técnica de extracção de DNA, adaptada de outros autores [Boom *et al.* 1990; McLauchlin *et al.* 2000; Alves *et al.* 2001], que assenta em quatro etapas. Assim, um mililitro da amostra, previamente processada e guardada a -80°C, é centrifugado a 23100 g, durante 10 minutos, seguindo-se:

**1) Lise celular:** Em tubos de 2 ml, pesam-se 0,3 g de partículas de zircónio com 0,5 mm de diâmetro (Biospec Products), adicionam-se 900 µl de tampão de lise (*vide* Anexo II), 60 µl de álcool isoamílico e, por último, 300 µl do sedimento obtido, após processamento das amostras. Agitam-se os tubos à velocidade máxima (2800 oscilações/minuto), durante dois minutos, no aparelho Mini Beadbeater (Biospec Products – Howawrd<sup>TH</sup> Industries). O tampão de lise provoca o rebentamento celular, que é exponenciado pelo *stress* mecânico, promovido pela acção das partículas de zircónio a alta velocidade. Por seu lado, o álcool isoamílico, é um composto orgânico, que actua, de imediato, como solvente de matéria orgânica proveniente da lise celular, sendo, por isso, indicado para protocolos de purificação de ácidos nucleicos. Prossegue-se com uma centrifugação a 20200 g, durante 15 segundos, de forma a sedimentar os detritos insolúveis, as partículas de zircónio, e, a dissipar a espuma que é produzida durante o processo de agitação no Mini Beadbeater. Esta etapa termina com a transferência do sobrenadante resultante da centrifugação para um microtubo de 1,5 ml.

**2) Adsorção de DNA:** Ao microtubo de 1,5 ml, adicionam-se 35 µl da suspensão aquosa de sílica activada (1%, pH 2,0) (*vide* Anexo II). A mistura é agitada vigorosamente e é deixada a incubar à temperatura ambiente, no agitador rotativo (Fröbel Labortechnik GmbH), a velocidade moderada, durante uma hora. Neste período de agitação constante, o DNA, por ter forte afinidade para as partículas de sílica activada, fica adsorvido a estas, saindo de solução. Após esta incubação, faz-se uma breve centrifugação, durante 15 segundos, a 23100 g, para que a sílica activada com o DNA adsorvido, sedimente. Despreza-se o sobrenadante e com este passo elimina-se uma grande quantidade de contaminantes e de moléculas que podem provocar interferências no decorrer da experimentação.

**3) Lavagem:** Cada uma das lavagens abaixo descritas consiste na ressuspensão da sílica em 200 µl da solução ou solvente apropriados e na centrifugação à velocidade máxima (23100 g), durante 15 segundos. Em primeiro lugar, fazem-se duas lavagens, com tampão de lavagem (*vide* Anexo II), de forma a que os detritos e as partículas contaminantes, que se encontram adsorvidos à sílica, sejam eliminados. Segue-se uma lavagem com etanol a 80%, que, basicamente, permite solver material orgânico contaminante. O mesmo sucede para a última lavagem, com acetona absoluta, que no final é desprezada, sendo o tubo colocado a secar no aparelho Block Heater (Stuart Scientific) a 70°C, até à evaporação completa do solvente.

**4) Eluição de DNA:** Ressuspende-se a sílica activada com o DNA adsorvido, em 50 µl de água desionizada estéril, incubando-se a 60°C, durante cinco minutos, no aparelho Block Heater, de forma a facilitar a eluição do DNA. Esta é considerada a temperatura ideal para que ocorra uma boa eluição do DNA da sílica para a água. Sedimenta-se a sílica por centrifugação a 23100 g, durante dois minutos, recolhendo-se o sobrenadante com o DNA dissolvido, para microtubos de 1,5 ml. Os tubos com as amostras de DNA em solução aquosa são devidamente guardados a -20°C.

#### **11.4.6. Diagnóstico molecular de *Pneumocystis jirovecii***

A técnica de PCR é uma das mais utilizadas em biologia molecular, tratando-se de um procedimento rápido, com baixos custos e que permite obter um elevado número de cópias, a partir de uma pequena quantidade de DNA. Esta técnica permite a amplificação específica de uma sequência de DNA, através de uma reacção de extensão, designada por *primer extension*, em ambas as cadeias da sequência molde. Deste modo, promove-se a síntese de uma cadeia complementar à cadeia molde, na direcção 5' → 3', por acção de uma enzima polimerase.

O processo de amplificação divide-se em três etapas, que se repetem ao longo de 30 a 50 ciclos:

- 1) Desnaturalização da cadeia dupla de DNA, por acção do aumento da temperatura (94°C a 95°C);
- 2) Ligação dos *primers* (*annealing*) às regiões complementares de ambas as cadeias e início da acção da polimerase (dependente da temperatura de hibridação específica de cada *primer*);
- 3) Extensão da reacção de polimerização, com incorporação de desoxirribonucleótidos (dNTPs), por acção da temperatura (72°C), que permite a acção contínua da polimerase.

Existe ainda um passo de activação da polimerase (95°C), que precede o início dos ciclos de amplificação e, um passo de extensão final (72°C), que garante um elevado rendimento dos produtos de reacção, e que ocorre após os ciclos de amplificação.

No presente estudo, o diagnóstico molecular de *P. jirovecii* consistiu na amplificação e detecção de um segmento de DNA específico (*mtLSU rRNA*), através da técnica de PCR *nested*, após extracção do DNA genómico do microrganismo.

Amplificação de um fragmento do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*. As secreções pulmonares submetidas para o diagnóstico da PPc que apresentaram resultado negativo pela técnica de IFI/AcM, foram submetidas à detecção de DNA específico de *P. jirovecii*. A identificação molecular foi efectuada por amplificação de um fragmento do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*, com 263 pb, através de uma PCR *nested*, descrita anteriormente [Wakefield *et al.* 1990a; Tamburrini *et al.* 1996; Matos 1999; Costa 2006]. Esta técnica de PCR consiste num protocolo bastante robusto e sensível, no que se refere à amplificação específica das regiões do DNA alvo, baseando-se em duas reacções de amplificação consecutivas, com dois conjuntos de sequências iniciadoras (*primers*) distintas, dirigidas para um gene multicópia do genoma de *P. jirovecii* (quadro XIII). O conjunto mais externo de *primers*, correspondente à 1ª parte da reacção de amplificação e, o outro, mais interno, correspondente à 2ª parte, ambos abrangendo a sequência de DNA a amplificar.

**Quadro XIII.** Sequências dos *primers* utilizados na amplificação do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii* por PCR *nested*, e suas características (dimensão do oligonucleótido, temperatura de hibridação, designada por  $T_A$ , conteúdo em CG e tamanho do fragmento de amplificação).

PCR	Primer	Sequencia (5'→3')	Dimensão (pb)	$T_A$ (°C)	GC (%)	Amplificação (pb)
1 <sup>a</sup>	pAZ 102-E	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	20	59,4	55	346
Parte	pAZ 102-H	GTGTACGTTGCAAAGTACTC	20	55,3	45	
2 <sup>a</sup>	pAZ 102-X	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	22	56,5	41	263
Parte	pAZ 102-Y	TCACTTAATATTAATTGGGGAGC	23	55,3	35	

A técnica de PCR *nested* comporta determinadas componentes e condições reaccionais indispensáveis. Assim, por cada amostra, preparou-se uma mistura de amplificação contendo 1x tampão de reacção (16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67 mM Tris-HCL [pH 8,8], 0,01% tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Applied Biosystems), 0,2  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (pAZ 102-E e pAZ 102-H na 1<sup>a</sup> parte; pAZ 102-X e pAZ 102-Y na 2<sup>a</sup> parte; MWG Biotech), 2,5 mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) (Bioline), 0,75 U de Biotaq<sup>TM</sup> DNA polimerase (Bioline), 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de albumina sérica bovina, BSA do inglês *bovine serum albumin* (SIGMA), 2  $\mu\text{l}$  de DNA genómico, obtido após extracção pelo método do Mini Beadbeater/tiocianato de guanidina-sílica, e água desionizada estéril, perfazendo o volume final de 50  $\mu\text{l}$ . Para monitorizar a qualidade dos resultados, em cada ensaio de amplificação, foram incluídos, um controlo positivo (suspensão de DNA de *P. jirovecii*) e um controlo negativo (água desionizada estéril), substituindo, nas respectivas reacções, os 2  $\mu\text{l}$  de DNA genómico das amostras. As componentes térmicas da reacção, descritas no quadro XIV, foram aplicadas num termociclador (T1 Thermocycler; Biometra), onde decorreu a amplificação do DNA de *P. jirovecii*.

**Quadro XIV.** Condições térmicas aplicadas na PCR *nested*, para amplificação específica do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*.

Condições de amplificação*		
Desnaturação inicial	95°C, 3 minutos	
Desnaturação	95°C, 1,5 minutos	x 40 ciclos
Ligação	55°C, 1,5 minutos	
Extensão	72°C, 2 minutos	
Extensão final	72°C, 10 minutos	

\*As condições térmicas de amplificação são iguais na 1ª e na 2ª parte da PCR *nested*.

Visualização do DNA amplificado. O DNA amplificado por PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose, para posterior avaliação dos produtos de amplificação. A 10 µl de produto de reacção, adicionou-se 1 µl de tampão de aplicação (Fermentas). Da mesma forma, a 1 µl de marcador molecular (Gene Ruler™ 100 pb; Fermentas), adicionou-se 1 µl de tampão de aplicação e 9 µl de água desionizada estéril. Numa tina de electroforese, aplicou-se um gel de agarose a 2% (m/v) (SeaKem® LE; FMC BioProducts), em tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8,3), no qual foi incorporado brometo de etídio (SIGMA), a uma razão de 0,5 mg/L. Aplicaram-se as amostras nos respectivos poços e, a separação electroforética foi efectuada a 60 volts (V), durante, aproximadamente, uma hora. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados, por acção de luz ultravioleta, num transiluminador (ECX-20.M; Vilber Lourmat). Os resultados foram registados com uma máquina fotográfica digital do sistema de aquisição de imagem incorporado ao transiluminador (PowerShot A710 IS; Canon). O DNA intercalado com as moléculas de brometo de etídio torna-se fluorescentes devido à presença deste composto químico, que, caracteristicamente, fica excitado, emitindo fluorescência quando lhe é incidida radiação ultravioleta. Assim, todas as amostras contendo DNA amplificado emitem a fluorescência característica, fornecida pelo brometo de etídio, podendo-se verificar a qualidade da reacção da PCR, pela determinação das dimensões moleculares dos fragmentos amplificados.

#### 11.4.7. Caracterização genética das regiões de interesse

A caracterização genética dos isolados de *P. jirovecii*, identificados por métodos parasitológicos e moleculares, e que cumpriram os critérios de inclusão do presente estudo, foi efectuada em 10 *loci*, considerados de interesse, nomeadamente, os genes *mtLSU rRNA*, *CYB*, *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *TRR1*, *TS*, *DHFR*, *DHPS*, *UCS* e *KEX1*.

Tendo por base as sequências nucleotídicas dos genes *CYB*, *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *TRR1*, *TS*, *UCS* e *KEX1*, foram desenhados *primers* específicos, utilizando-se o programa bioinformático Primer 3.0 Program (versão 0.4.0), disponível *on-line* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>). A escolha dos *primers* para amplificação das regiões de interesse, obedeceu a critérios que incluíram, as dimensões das sequências oligonucleotídicas, as características conservadas das zonas de ligação (*annealing*), a temperatura de hibridação, o conteúdo CG, a ausência de estruturas secundárias e de dímeros de *primers*. Estes *primers* foram desenhados para uma temperatura de hibridação de 61,5°C, tendo sido sintetizados pela MWG Biotech. Os genes *mtLSU rRNA* e *DHFR* foram amplificados recorrendo-se a pares de *primers*, previamente descritos [Wakefield *et al.* 1990a; Tamburrini *et al.* 1996; Ma *et al.* 1999]. Para estes dois *loci*, de entre as sequências disponíveis, foram seleccionados os pares de *primers* que apresentaram melhores resultados de amplificação (bandas bem definidas após corrida electroforética em gel de agarose e elevadas quantidades de produto de PCR). Finalmente, o gene *DHPS* foi caracterizado utilizando-se a técnica de PCR *nested*, seguida de RFLP [Helweg-Larsen *et al.* 2000; Costa *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008]. No quadro XV, encontram-se descritas todas as sequências de oligonucleótidos, utilizadas para a caracterização dos genes em estudo, e as dimensões dos respectivos produtos de PCR (amplicões).



**Quadro XV.** Sequências nucleotídicas e características (dimensão do oligonucleótido, temperatura de hibridação, designada por  $T_A$ , conteúdo em CG e tamanho do fragmento de amplificação) dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciação directa dos genes considerados de interesse para o estudo da variabilidade genética de *P. jirovecii* e da sua potencial relação com factores da infecção.

<i>Locus</i>	<i>Primer</i>	Sequencia (5'→3')	Dimensão (pb)	$T_A$ (°C)	GC (%)	Amplificação (pb)
<i>mtLSU rRNA</i>	pAZ102-X <sup>a</sup>	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	22	56,5	41	304
	pAZ102-E <sup>a</sup>	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	20	59,4	55	
<i>CYB</i>	CytbFw	CCCAGAATTCTCGTTTGGTCTATT	24	61,8	42	638
	CytbRw	AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCTCAA	25	61,1	40	
<i>SOD</i>	MnSODFw	GGGTTTAATTAGTCTTTTATAGGCAC	25	61,8	36	448
	MnSODRw	CACTTCCTTGAATCCCAGACAA	22	61,4	58	
<i>B TUB</i>	B-tubFw	GAGGGAGCGGAATTGGTAGATA	22	61,6	50	541
	B-tubRw	GGAGCAAACCCAACCATGA	19	61,9	53	
<i>TRR1</i>	TRR1Fw	ATGGCAACTGGGGCGTAT	18	61,3	56	631
	TRR1Rw	CAAGTCCTGCCATACATCCACT	22	61,3	50	
<i>TS</i>	TSFw	GTTTCAATGGCGACACTTCG	20	61,6	50	376
	TSRw	GGAACACCTAGCCCCATGTC	20	61,7	60	
<i>DHFR</i>	FR208 <sup>b</sup>	GCAGAAAGTAGGTACATTATTACGAGA	27	58,6	37	831
	FR1018 <sup>b</sup>	GCTTCAAACCTTGTGTAAACGCG	22	64,0	50	
<i>DHPS</i> (1ª Parte)	Dp15 <sup>c</sup>	TCTGAATTTTATAAAGCGCCTACAC	25	58,1	36	785
	Dp800 <sup>c</sup>	ATTTCATAAACATCATGAACCCG	23	55,3	35	
<i>DHPS</i> (2ª Parte)	DHFR-NF <sup>d</sup>	AAATGCAGGGGCGACGATAAT	21	57,2	48	186
	DHPS-NR <sup>d</sup>	GCCTTAATTGCTTGTCTGCAA	22	54,5	41	
<i>UCS</i>	UCSFw	GCCCATCTCCTGTTTATAGTGTCTTA	25	61,9	44	814
	UCSRw	AAATGCATCCTAAGCTCCAAGTC	23	61,0	43	
<i>KEX1</i>	KEX1Fw	GACGATGATGGAAAACTGTTGA	23	61,3	39	738
	KEX1Rw	TGGGTTGGATATGACTAGTGAAGACT	26	61,4	42	

Os *primers* para amplificação dos genes *CYB*, *SOD*, *β TUB*, *TRR1*, *TS*, *UCS* e *KEX1*, foram desenhados no decorrer do presente estudo. Os restantes *primers* foram previamente descritos por outros autores:

<sup>a</sup> [Wakefield *et al.* 1990a; Tamburrini *et al.* 1996]

<sup>b</sup> [Ma *et al.* 1999]

<sup>c</sup> [Helweg-Larsen *et al.* 1999]

<sup>d</sup> [Costa *et al.* 2005]

Amplificação dos genes de interesse. As componentes experimentais para a amplificação das regiões de interesse de todos os genes, à excepção do *DHPS*, foram optimizadas, compreendendo um volume final de 25 µl contendo, por cada amostra, 1x tampão de reacção (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL [pH 8,3]; Applied Biosystems), 0,5 mM de cada dNTP (Applied Biosystems), 0,5 µM de cada *primer* (MWG Biotech), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 0,01 µg/µl de BSA (SIGMA), 1 µl de dimetilsulfóxido (DMSO; SIGMA), 2 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. Em cada ensaio, a qualidade das reacções foi avaliada recorrendo-se a um controlo positivo e a um controlo negativo. As condições térmicas (T1 Thermocycler; Biometra) encontram-se discriminadas no quadro XVI. O passo de desnaturação inicial permite, não só a desnaturação do DNA, mas também a activação da AmpliTad Gold, uma enzima de polimerização modificada quimicamente, que é activada após ser submetida às condições descritas (10 minutos a 95°C). A visualização dos resultados foi efectuada pela técnica de electroforese em gel de agarose, conforme o descrito na secção 11.4.6.

**Quadro XVI.** Condições das reacções de amplificação dos genes *mtLSU rRNA*, *CYB*, *SOD*, *β TUB*, *TRR1*, *TS*, *DHFR*, *UCS* e *KEX1* de *P. jirovecii*.

Condições de amplificação		
Desnaturação inicial	95°C, 10 minutos	
Desnaturação	95°C, 1 minuto	x 40 ciclos
Ligação	55°C, 1 minuto	
Extensão	72°C, 1 minuto	
Extensão final	72°C, 10 minutos	

A amplificação do gene *DHPS* foi efectuada através de PCR *nested*. Para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 50 µl, contendo 1x tampão de reacção (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCL [pH 8,8], 0,01% tween-20; Bioline), 0,8 mM de cada dNTP (Applied Biosystems), 0,4 µM de cada *primer* (Dp15 e Dp800 na 1ª parte; DHPS-NF e DHPS-NR na 2ª parte; MWG Biotech), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 1,5 U de Biotaq<sup>TM</sup> DNA polimerase (Bioline), 0,01 µg/µl de BSA (SIGMA), 5 µl de DNA genómico e água desionizada estéril para perfazer os 50 µl de reacção. Em cada ensaio, foram incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. A reacção de

amplificação foi efectuada num termociclador (T1 Thermocycler; Biometra), segundo as condições térmicas descritas no quadro XVII. A visualização dos resultados foi efectuada pela técnica de electroforese em gel de agarose, conforme o descrito na secção 11.4.6.

**Quadro XVII.** Condições térmicas de amplificação do gene *DHPS* de *P. jirovecii*, por PCR *nested*.

Condições de amplificação*		
Desnaturação inicial	94°C, 3 minutos	
Desnaturação	94°C, 30 segundos	x 40 ciclos
Ligação	62°C, 30 segundos	
Extensão	72°C, 45 segundos	
Extensão final	72°C, 10 minutos	

\* As condições térmicas de amplificação são iguais na 1ª e 2ª parte da PCR *nested*.

Purificação dos produtos de PCR. Os produtos de PCR caracterizam-se por conterem diversos compostos, tais como, *primers*, dNTPs não incorporados, sais, entre outros desperdícios, resultantes dos ciclos de amplificação, os quais podem interferir, como contaminantes, na reacção de sequenciação, sendo, por isso, necessário um passo de remoção destes compostos, antes do processo de sequenciação ter início. Deste modo, os produtos de amplificação das PCRs realizadas aos genes *mtLSU rRNA*, *CYB*, *SOD*,  *$\beta$  TUB*, *TRR1*, *TS*, *DHFR*, *UCS* e *KEX1*, foram purificados, através de um protocolo comercial (JETQUICK PCR Product Purification Spin kit; Genomed), que permite a remoção rápida de impurezas e de contaminantes de produtos de PCR, após corrida electroforética em gel de agarose, e que consiste em quatro passos definidos:

**1) Solubilização da agarose:** Cortam-se, cuidadosamente, as regiões do gel de agarose, correspondentes às bandas com as dimensões pretendidas, excluindo as moléculas de tamanho indesejado, o que permite, desde logo, a eliminação de dímeros de *primers* e de outros subprodutos inespecíficos. As porções de gel de agarose são colocadas em microtubos de 1,5 ml. De acordo com o fabricante, por cada 100 mg de gel, adicionam-se, proporcionalmente, 300  $\mu$ l da solução L1. A mistura vai a incubar a 50°C durante 30 minutos, agitando-se vigorosamente, em intervalos de 10 minutos.

A solução L1 contém percloreto de sódio, um agente que, quando utilizado em elevadas concentrações, remove complexos proteicos presentes em solução, acetato de sódio, cuja acção visa precipitar os ácidos nucleicos em solução, e Tris-Borato-EDTA (TBE), um tampão que, em conjunto com o aumento da temperatura, auxilia na solubilização da agarose.

**2) Adsorção:** A adsorção do DNA é realizada numa coluna específica (JETQUICK spin column; Genomed), que é colocada num tubo colector de 2 ml e para onde se transfere a mistura (aproximadamente 400 µl). Esta coluna possui uma matriz de sílica que é um material com alta afinidade para as moléculas de DNA, carregadas negativamente. Centrifuga-se à velocidade máxima (23100 g), durante um minuto, sendo que no final se descarta o tubo com o filtrado.

**3) Lavagem:** Esta etapa consiste na remoção de contaminantes, onde se volta a colocar a coluna num tubo colector de 2 ml, adicionando-se 500 µl de solução H2. A solução H2 é composta por EDTA, um forte agente quelante, aplicado para aprisionar iões monovalentes, Tris-HCl, um tampão que auxilia na manutenção do pH, funcionando como agente estabilizador da solução, etanol, que funciona como um forte solvente orgânico, e cloreto de sódio, utilizado para manter e estabilizar as cargas iónicas. Volta-se a centrifugar à velocidade máxima, durante um minuto. Despreza-se o filtrado, coloca-se novamente a coluna no tubo colector e promove-se nova centrifugação, igual à anterior, descartando-se, no final, o tubo com o filtrado. Esta segunda centrifugação tem por finalidade a remoção total do etanol, composto orgânico considerado como um contaminante limitante da reacção de sequenciação.

**4) Eluição do DNA:** Coloca-se a coluna num microtubo de 1,5 ml e adicionam-se 50 µl de água desionizada estéril, pré-aquecida no aparelho Block Heater (Stuart Scientific) a 60°C. A água deve ser vertida no centro da matriz de sílica, de forma a ter uma distribuição uniforme e a solver o máximo de moléculas de DNA. Centrifuga-se à velocidade máxima, durante dois minutos e no final recupera-se o filtrado com o DNA purificado, conservando-o a -20°C. O controlo de qualidade da

purificação é realizado através da técnica de electroforese em gel de agarose (1%), tal como o descrito na secção 11.4.6.

Identificação e caracterização dos amplicões. Após purificação, os produtos de PCR foram submetidos a sequenciação directa, no Laboratório de Sequenciação da MacroGen (Seoul, Coreia do Sul), num sequenciador automático (3730 XL DNA Analyser; Applied Biosystems) com tecnologia de electroforese capilar em gel de poliacrilamida. Todas as sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos, e a análise dos fragmentos foi efectuada, recorrendo-se a programas de bioinformática específicos, como, o ChromasPro (versão 1.22, Technelysium Pty Ltd.), o BLAST (versão 2.2) disponível no sítio do *National Centre for Biotechnology Information's* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e o CLUSTAL W2 (versão 2.0.12) disponível no sítio do *European Bioinformatics Institute* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). Os fragmentos onde foram identificadas sequências polimórficas, foram novamente amplificados e sequenciados, para confirmação dos resultados. A identificação dos genótipos *DHPS* de *P. jirovecii* foi efectuada por análise dos perfis de restrição do DNA, previamente amplificado, por PCR *nested*. Esta combinação PCR *nested* seguida de RFLP, é um procedimento rápido, com menores custos do que a PCR seguida de sequenciação directa e previamente implementada com sucesso no laboratório onde se realizou o estudo. Pela técnica de RFLP, as endonucleases de restrição, seleccionadas, permitem o corte da sequência de nucleótidos nos codões 55 e 57 do alelo selvagem (*vide* 11.3.3, quadro IX). Por outro lado, a presença de mutações nestes codões, impede a hidrólise da sequência, pois não existe o reconhecimento da zona dos nucleótidos alvo, por parte das enzimas de restrição. Para a identificação do genótipo no codão 55 (*DHPS165*), a reacção de hidrólise foi preparada com 2 µl de tampão de restrição B<sup>+</sup> (Fermentas), 10 U de endonuclease *AccI* (Fermentas), 10 µl de DNA amplificado e água desionizada estéril, até completar o volume final de 20 µl. Para a detecção da mutação no codão 57 (*DHPS171*), a reacção de hidrólise foi preparada da mesma forma que para o codão 55, no entanto, a endonuclease utilizada foi a *HaeIII*, com o respectivo tampão de restrição R<sup>+</sup> (Fermentas). Em ambos os procedimentos, a mistura reaccional foi incubada a 37°C, durante a noite. Os 20 µl de produto de hidrólise foram separados e visualizados por electroforese em gel de agarose (2,5%), conforme o descrito na secção 11.4.6.

#### 11.4.8. Informação clínica

A recolha de informação clínica sobre os casos de PPc, dos quais foram obtidas as secreções pulmonares, permitiu que se averigua-se a existência de potenciais associações entre os parâmetros da doença e as características genéticas dos isolados de *P. jirovecii*, responsáveis pela infecção. A informação clínica consistiu na recolha de dados relativos à contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, ao diagnóstico e evolução clínica dos casos em estudo, e aos regimes profiláticos e terapêuticos instituídos, sendo de referir que o presente projecto de investigação foi submetido e aprovado pelos conselhos de ética das instituições envolvidas (Anexo III).

Diagnóstico clínico de PPc. Consiste na presença de pelo menos duas das seguintes variáveis: sintomas como tosse não produtiva, febre e dispneia; radiograma do tórax sugestivo de PPc; PaO<sub>2</sub> no sangue periférico inferior a 65 mmHg.

Contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Os doentes foram agrupados de acordo com a contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, correspondente à altura da colheita da amostra. A obtenção das contagens de células TCD4<sup>+</sup>, permitiram distinguir os doentes, com base no seu estado imunitário, e no respectivo risco de desenvolverem a infecção: 1) grupo de baixo risco (mais de 200 células/mm<sup>3</sup>); grupo de risco moderado (entre 50 e 200 células/mm<sup>3</sup>); grupo de risco elevado (menos de 50 células/mm<sup>3</sup>).

Profilaxia e terapêutica. A implementação, ou ausência, de regimes profiláticos ou terapêuticos foi tida em conta, pois esta informação é considerada de extrema importância para o estudo da resistência de *P. jirovecii*, em especial dos genes que, de alguma forma, estão relacionados com as moléculas alvo da acção dos fármacos. Assim, na altura da colheita das secreções pulmonares, foram registados os dados relativos à profilaxia (toma de um comprimido de TMP-SMZ forte, diariamente, ou, três comprimidos de TMP-SMZ forte por semana, por um período mínimo de dois meses), e/ou, terapêutica (toma de 15 a 20 mg/Kg/dia de TMP associado a 75 a 100 mg/Kg/dia de SMZ, fornecido em três a quatro doses diárias, por via oral ou endovenosa, durante 21 dias) dos doentes com TMP-SMZ. Nenhum caso com outro fármaco foi considerado,

pois, a associação TMP-SMZ (fármaco de primeira linha) é utilizada na grande generalidade dos casos de PPc, em Portugal.

Evolução clínica do doente. Consiste na avaliação de factores, tais como, a resposta à terapêutica anti-*P. jirovecii* e a sobrevivência após o diagnóstico da pneumocistose. Assim, um caso com evolução clínica favorável é compatível com uma resposta favorável à terapêutica anti-*P. jirovecii*, conjuntamente com uma sobrevivência de, pelo menos, quatro semanas, após o diagnóstico da infecção. Por outro lado, a evolução clínica desfavorável, corresponde a um caso, onde se verifica uma resposta desfavorável à terapêutica anti-*P. jirovecii* (insucesso na melhoria do estado clínico do doente após dez ou mais dias de administração do fármaco anti-*P. jirovecii* em dose terapêutica), ou, quando o doente falece durante o episódio de PPc.

#### **11.4.9. Análise dos resultados**

Com o intuito de identificar SNPs de *P. jirovecii* relevantes, procedeu-se à avaliação da potencial existência de correlação entre os polimorfismos detectados, nas dez regiões genómicas em estudo, e as características epidemiológicas e clínicas dos doentes. Para isso, os resultados de genotipagem foram correlacionadas com os períodos de colheita das amostras, com o sexo e idade dos doentes, com a carga parasitária dos isolados, com a contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, com o diagnóstico clínico da PPc, com a evolução clínica da infecção e com os regimes profilático e terapêutico.

Análise estatística. Considerando o número e a natureza das variáveis e o tipo de resposta pretendida, o teste estatístico seleccionado foi o teste do Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ). Assim, o teste  $\chi^2$  foi aplicado para investigar a associação entre variáveis qualitativas, recorrendo-se ao programa informático SPSS, do inglês *statistical package for social sciences*, (versão 16.0; SPSS Inc., Chicago, USA). Os dados foram agrupados em tabelas de contingência de duas entradas e a análise foi efectuada com um intervalo de confiança de 95%, de onde resultaram associações, estatisticamente significativas, quando o valor de *P* foi inferior ou igual a 0,05. Foram distinguidos os seguintes níveis de significância:  $P \leq 0,05$  (A);  $P \leq 0,01$  (B);  $P \leq 0,005$  (C);  $P \leq 0,001$  (D).

Análise de componentes principais. Uma análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) foi efectuada com o objectivo de investigar correlações entre diversas variáveis, em especial, entre os SNPs e os dados clínicos dos doentes, utilizando o programa informático Numerical Taxonomy System (versão NTSYSpc 2.2; Exeter Software, New York, USA). Este método não paramétrico envolve uma transformação linear das variáveis em coordenadas de sistema, onde a maior variância, por qualquer que seja a projecção dos dados, corresponde à primeira coordenada (primeira componente principal), a segunda maior variância, corresponde à segunda coordenada (segunda componente principal), e as grandezas de variância que se seguem, correspondem aos restantes componentes [Daffertshofer *et al.* 2004].

Estudo de distribuição de genótipos e clonalidade. O teste recombinatório d1 foi aplicado para estudar desvios à distribuição panmítica, na população de *P. jirovecii*, em Portugal. Este teste é bastante útil para investigar a existência de desvios à recombinação aleatória, do inglês *random mating*, em populações de microrganismos parasitários. Pode ser aplicado, independentemente do nível de plóidia do organismo em estudo, baseando-se na hipótese nula, com troca aleatória de material genético entre os organismos de uma mesma população, demonstrando as consequências do desequilíbrio de ligação, do inglês *linkage disequilibrium*, que pode ser verificada entre diversos *loci*. O teste pressupõe uma análise combinatória, fornecendo a probabilidade de uma amostra, proveniente de uma determinada população, conter tantos ou mais indivíduos com um genótipo particular, do que aquilo que seria de esperar. Assim, a extensão em que determinados genótipos estão sobre-representados pode ser quantificada pelo cálculo da probabilidade,  $P$ , de observar tantos ou mais indivíduos, com um determinado genótipo, do que aquilo que realmente é esperado, quando se está perante uma população com distribuição panmítica [Tibayrenc *et al.* 1990; Jimenez *et al.* 1997; Abderrazak *et al.* 1999]. As sequências dos genótipos multilocus foram utilizadas para a construção de um dendrograma, efectuada com o apoio do programa informático CLUSTAL W2 (versão 2.0.12) disponível no sítio do *European Bioinformatics Institute* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). Adicionalmente, o fenómeno de desequilíbrio de ligação foi também estudado, aplicando o programa bioinformático SNPStats disponível no sítio do



*Biostatistics and Bioinformatics Unit* do *Catalan Institute of Oncology* ([www.iconcologia.net](http://www.iconcologia.net)), considerando-se um resultado estatisticamente significativo, quando o valor de  $P$  foi inferior ou igual a 0,05.

### 11.5. Resultados

No decorrer da presente investigação foram analisados 102 isolados de *P. jirovecii* obtidos de doentes seropositivos para VIH. Destas amostras, 78 (76%) foram obtidas de doentes com casos confirmados de PPc (identificação parasitológica e detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc, ou seja, com um quadro clínico compatível), 16 (16%) foram obtidas de doentes com apresentação clínica atípica de PPc (identificação parasitológica e detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, não preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc, ou seja, apresentando um quadro clínico atípico) e oito (8%) foram obtidas de doentes colonizados com infecção subclínica de *P. jirovecii* (identificação parasitológica negativa para *P. jirovecii*, detecção molecular positiva para *P. jirovecii*, não preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc). A informação relativa aos parâmetros em estudo (carga parasitária, contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, diagnóstico clínico de PPc, evolução clínica dos doentes, profilaxia e terapêutica) encontra-se resumida no quadro XVIII.

#### 11.5.1. Análise da variação genética das regiões de interesse

*mtLSU rRNA*. No presente trabalho, o gene *mtLSU rRNA* foi estudado nos 102 isolados em análise. Para este *locus*, amplificado e sequenciado com sucesso em 92 (90%) isolados, foram detectados polimorfismos nas posições 85 e 248 (quadro XIX). É de referir que a combinação de SNPs *mt85A/mt248T* foi detectada pela primeira vez num isolado, no decorrer do presente trabalho, e a respectiva sequência foi depositada na base de dados do GenBank do sítio do *National Centre for Biotechnology Information's* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), com o código de acesso EU979566 [Esteves *et al.* 2010b].

**Quadro XVIII.** Informação clínica e parâmetros da doença correspondentes aos isolados de *P. jirovecii* dos doentes envolvidos no estudo.

Parâmetros da infecção	Número de isolados, N (%)
<b>Carga parasitária</b>	<b>102</b>
Baixa	25 (24)
Moderada	54 (53)
Elevada	23 (23)
<b>Contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup></b>	<b>81</b>
>200 células/mm <sup>3</sup>	8 (10)
50-200 células/mm <sup>3</sup>	21 (26)
<50 células/mm <sup>3</sup>	52 (64)
Sem informação	21
<b>Diagnóstico clínico de PPc</b>	<b>102</b>
Compatível	77 (75)
Não compatível	25 (25)
<b>Evolução clínica</b>	<b>46</b>
Positiva	32 (70)
Negativa	14 (30)
Sem informação	56
<b>Profilaxia</b>	<b>88</b>
Sem regime profilático anti- <i>P. jirovecii</i>	64 (73)
TMP-SMZ em dose profilática	24 (27)
Sem informação	14
<b>Terapêutica</b>	<b>84</b>
Sem regime terapêutico anti- <i>P. jirovecii</i>	20 (24)
TMP-SMZ em dose terapêutica	64 (76)
Sem informação	18

**Quadro XIX.** SNPs detectados no gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>mt85</i>	85 : C	46 (50)
	85 : A	19 (21)
	85 : T	14 (15)
	85 : C/T *	9 (10)
	85 : C/A *	3 (3)
	85 : A/T *	1 (1)
<i>mt248</i>	248 : C	83 (90)
	248 : T	7 (8)
	248 : C/T *	2 (2)

\* Isolados com mais do que um nucleótido por base (mistura de genótipos).

CYB. O gene que codifica para o citocromo *b* de *P. jirovecii*, foi estudado em 80 isolados, tendo sido amplificado e sequenciado com sucesso em 49 (61%). A análise das sequências resultou na identificação de polimorfismos, no exão do gene, nas posições 279, 348, 516, 547, 566 e 838 (quadro XX). O SNP na base 566, detectado numa amostra, pela primeira vez, implica a substituição de uma citosina por uma timina, que conduz a uma alteração no aminoácido 189, onde uma serina é substituída por uma leucina. A combinação de SNPs *279C/348G/516T/547C/566C/838C* foi detectada pela primeira vez em dois isolados, no decorrer do presente trabalho. Estas sequências foram depositadas na base de dados do GenBank com os códigos de acesso EU979567 e EU979568 [Esteves *et al.* 2010b].

SOD. O gene que codifica para a superóxido dismutase dependente de manganésio de *P. jirovecii*, foi estudado em 80 isolados. Destes, 46 (58%) foram amplificados e sequenciados com êxito, tendo sido observada variabilidade nas bases nucleotídicas 110 (intrão 2) e 215 (exão 3) (quadro XXI).

**Quadro XX.** SNPs detectados no gene *CYB* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>CYB279</i>	279 (93) : C (Ile)	46 (94)
	279 (93) : T (Ile)	3 (6)
<i>CYB348</i>	348 (116) : A (Gly)	47 (96)
	348 (116) : G (Gly)	2 (4)
<i>CYB516</i>	516 (172) : C (Ile)	41 (84)
	516 (172) : T (Ile)	8 (16)
<i>CYB547</i>	547 (183) : C (Leu)	46 (94)
	547 (183) : T (Leu)	3 (6)
<i>CYB566</i>	566 (189) : C (Ser)	48 (98)
	566 (189) : T (Leu)	1 (2)
<i>CYB838</i>	838 (280) : C (Leu)	39 (80)
	838 (280) : T (Phe)	8 (16)
	838 (280) : C/T (Leu/Phe) *	2 (4)

\* Isolados com mais do que um nucleótido por base (mistura de genótipos).

**Quadro XXI.** SNPs detectados no gene *SOD* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>SOD110</i>	110 : C	27 (59)
	110 : T	17 (37)
	110 : C/T *	2 (4)
<i>SOD215</i>	215 (41) : T (Asp)	26 (57)
	215 (41) : C (Asp)	13 (28)
	215 (41) : C/T (Asp) *	7 (15)

\* Isolados com mais do que um nucleótido por base (mistura de genótipos).

*$\beta$  TUB*. O locus  *$\beta$  TUB* foi caracterizado com sucesso em 45 (64%), de um total de 70 isolados, estudados para este gene. Foram detectados polimorfismos nas bases 282 e 327 (exão 4) (quadro XXII). O polimorfismo sinónimo na base 327, detectado pela primeira vez num isolado de *P. jirovecii*, corresponde a uma substituição de uma guanina por uma timina. A sequência com o referido polimorfismo foi depositada na base de dados do GenBank com o código de acesso EU979570 [Esteves *et al.* 2010b].

**Quadro XXII.** SNPs detectados no gene  $\beta$  *TUB* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
$\beta$ <i>TUB</i> 282	282 (93) : G (Leu)	14 (25)
	282 (93) : A (Leu)	36 (66)
	282 (93) : G/A (Leu) *	5 (9)
$\beta$ <i>TUB</i> 327	327 (106) : G (Ser)	53 (96)
	327 (106) : T (Ser)	2 (4)

\* Isolados com mais do que um nucleótido por base (mistura de genótipos).

*TRR1*. Trinta amostras foram analisadas com sucesso para o gene *TRR1*, nas quais, foi identificado, pela primeira vez, em apenas uma amostra, um polimorfismo sinónimo na posição 4414 (Exão 5), onde uma adenina foi substituída por uma guanina (quadro XXIII). A sequência correspondente foi depositada na base de dados do GenBank com o código de acesso EU979569 [Esteves *et al.* 2010b].

**Quadro XXIII.** SNP detectado no gene *TRR1* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>TRR</i> 4414	4414 (249) : A (Glu)	29 (97)
	4414 (249) : G (Glu)	1 (3)

*TS*. O gene que codifica a timidilato sintetase de *P. jirovecii*, também foi estudado em 30 amostras, sendo que nenhum polimorfismo foi identificado, ou seja, todos os isolados demonstraram a presença da sequência selvagem do gene *TS*. A sequência correspondente foi depositada na base de dados do GenBank com o código de acesso EU979572 [Esteves *et al.* 2010b].

*DHFR*. O gene *DHFR* foi caracterizado com êxito em 70 (69%) dos 102 isolados analisados para este *locus*. A análise das sequências resultou na identificação de polimorfismos nas posições 312 e 381 (exão 2) (quadro XXIV). O SNP na base 381, detectado numa amostra, pela primeira vez, implica a substituição de uma citosina por uma adenina, que conduz a uma alteração no aminoácido 140, onde uma serina é

substituída por uma arginina. A respectiva sequência foi depositada na base de dados do GenBank com o código de acesso EU979571 [Esteves *et al.* 2010b].

**Quadro XXIV.** SNPs detectados no gene *DHFR* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>DHFR312</i>	312 (117) : T (Gly)	55 (79)
	312 (117) : C (Gly)	14 (20)
	312 (117) : C/T (Gly) *	1 (1)
<i>DHFR381</i>	381 (117) : C (Ser)	69 (99)
	381 (117) : A (Arg)	1 (1)

\* Isolados com mais do que um nucleótido por base (mistura de genótipos).

*DHPS*. O gene *DHPS* foi caracterizado com sucesso em 83 (81%) das 102 amostras estudadas por PCR *nested* seguida de RFLP, confirmando-se a ocorrência de polimorfismos não sinónimos, no exão do gene, nas posições 165 e 171, que implicam mutações nos aminoácidos 55 e 57 (quadro XXV).

**Quadro XXV.** SNPs detectados no gene *DHPS* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>DHPS165</i>	165 (55) : A (Thr)	77 (93)
	165 (55) : G (Ala)	3 (4)
	165 (55) : A/G (Thr/Ala) *	3 (4)
<i>DHPS171</i>	171 (57) : C (Pro)	76 (92)
	171 (57) : T (Ser)	4 (5)
	171 (57) : C/T (Pro/Ser) *	3 (4)

\* Isolados com mais do que um nucleótido por base (mistura de genótipos).

*UCS*. A região subtelomérica conservada *UCS* foi estudada em 80 amostras, das quais 26 (33%) foram amplificadas e sequenciadas com êxito. Dois novos polimorfismos foram identificados no intrão desta região, na posição 1802, onde uma citosina é substituída por uma timina, e na posição 1889, onde uma guanina é substituída por uma adenina (quadro XXVI). No presente estudo, foram detectadas as

três sequências de repetição da região *UCS* diferentes (*vide* 11.3.4, quadro X). A combinação de sequências de repetição 1/2/3 foi a mais comum (19 isolados; 73%), seguida da combinação 1/2/3/3 (6 isolados; 23%) e da combinação 1/1/2/3 (1 isolado; 4%), observada pela primeira vez, no decorrer deste trabalho. As sequências, identificadas pela primeira vez no decorrer do presente estudo, foram depositadas na base de dados do GenBank com os códigos de acesso EU431323, EU431324, EU431325 e EU431326 [Esteves *et al.* 2009].

**Quadro XXVI.** SNPs detectados na região *UCS* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>UCS1802</i>	1802 : C	24 (92)
	1802 : T	2 (8)
<i>UCS1889</i>	1889 : G	16 (62)
	1889 : A	10 (38)

*KEX1*. O gene *KEX1* foi estudado em 80 isolados. Para este *locus*, amplificado e sequenciado com sucesso em 28 (35%) isolados, foram detectados, pela primeira vez, polimorfismos sinónimos, no exão do gene, nas posições 1322 e 1412, onde ocorrem substituições de citosina por timina, e 1668 onde ocorre uma substituição de uma guanina por uma citosina, e um polimorfismo não sinónimo na base 1543, onde se verifica a substituição de uma guanina por uma adenina, implicando alteração na cadeia de aminoácidos, onde, na posição 277, o ácido aspártico é substituído por uma asparagina (quadro XXVII). As sequências com as referidas variações nucleotídicas foram depositadas na base de dados do GenBank com os códigos de acesso EU431327, EU437385, EU797518 e EU797519 [Esteves *et al.* 2009].

É de referir que, devido à limitação da quantidade de amostra, e por consequência da quantidade de DNA disponível, não foi possível no decorrer do presente estudo, analisar todas as amostras para todos os genes de interesse. No que diz respeito aos genes *TRR1* e *TS*, estes foram estudados inicialmente em 30 isolados, seleccionados de forma aleatória entre as 102 amostras. Devido à pouca, ou mesmo



nenhuma variabilidade destas sequências, não foram realizados mais estudos de caracterização molecular, em outras amostras, para estes dois *loci*.

**Quadro XXVII.** SNPs detectados no gene *KEX1* de *P. jirovecii*.

SNP	Nucleótido (aminoácido) (posição : identidade)	Número de isolados, N (%)
<i>KEX1322</i>	1322 (217) : C (Asn)	27 (96)
	1322 (217) : T (Asn)	1 (4)
<i>KEX1412</i>	1412 (247) : C (Ile)	27 (96)
	1412 (247) : T (Ile)	1 (4)
<i>KEX1543</i>	1543 (277) : G (Asp)	27 (96)
	1543 (277) : A (Asn)	1 (4)
<i>KEX1668</i>	1668 (318) : G (Gly)	27 (96)
	1668 (318) : C (Gly)	1 (4)

Na análise das amostras dos seis doentes com duas secreções pulmonares obtidas durante o episódio de PPc, foi possível estudar-se a variabilidade de sete *loci* distintos (*mtLSU rRNA*, *CYB*, *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *DHFR*, *DHPS* e *KEX1*). Verificou-se que em três destes casos, houve alteração dos SNPs, entre a primeira e a segunda amostra. Num dos doentes, o SNP *mt85T* detectado na primeira amostra, alterou para *mt85C* na segunda amostra. Noutro doente, *mt248T* observado na primeira amostra, foi substituído por *mt248C* na segunda amostra. Por fim, a combinação de SNPs *mt85C/mt248T/SOD110T/SOD215C/KEX1412C* detectada na primeira amostra, foi substituída por *mt85T/mt248C/SOD110C/SOD215T/KEX1412T* na segunda amostra.

#### 11.5.2. Variabilidade genética de *Pneumocystis jirovecii* e parâmetros clínicos da pneumocistose

A análise estatística descritiva foi efectuada com o objectivo de relacionar os resultados da genotipagem com os dados demográficos e com os parâmetros clínicos dos doentes englobados no estudo. Os isolados contendo mais do que um nucleótido numa determinada base (mistura de genótipos), contribuíram para os testes estatísticos, com dois ou mais genótipos putativos. Para além das associações entre os polimorfismos e os dados clínicos e demográficos dos doentes englobados no estudo,

foram também analisadas potenciais associações entre os SNPs detectados. A análise cruzada das sequências dos 10 *loci* estudados permitiu detectar algumas correlações estatisticamente significativas (quadro XXVIII). O polimorfismo *SOD215C* foi mais frequente entre os isolados com *mt85C* (13 em 20 isolados, 65%;  $P = 0,010$ ); nos isolados com *mt85A*, *DHFR312T* foi detectado com maior frequência (19 em 20 isolados, 95%;  $P = 0,045$ ); *SOD215T* foi mais frequente nos isolados com *mt248C* (30 em 38 isolados, 79%;  $P = 0,017$ ); *DHFR312T* foi claramente mais comum entre os isolados com *CYB516C* (26 em 28 isolados, 93%;  $P = 0,044$ ); o polimorfismo *SOD110C* foi mais frequente nos isolados com *SOD215T* (27 em 33 isolados, 82%;  $P = 0,001$ ); inversamente, *SOD110T* foi mais comum nos isolados com *SOD215C* (13 em 20 isolados, 65%;  $P = 0,004$ ).

**Quadro XXVIII.** Correlações estatísticas entre SNPs dos 10 *loci* em estudo (frequências dos SNPs e níveis de significância).

SNP 1	SNP 2	Frequência do SNP 1 nos isolados com o SNP 2, N (%)
<i>SOD215C</i>	<i>mt85C</i>	13 em 20 (65) <sup>B</sup>
<i>DHFR312T</i>	<i>mt85A</i>	19 em 20 (95) <sup>A</sup>
<i>SOD215T</i>	<i>mt248C</i>	30 em 38 (79) <sup>A</sup>
<i>DHFR312T</i>	<i>CYB516C</i>	26 em 28 (93) <sup>A</sup>
<i>SOD110C</i>	<i>SOD215T</i>	27 em 33 (82) <sup>D</sup>
<i>SOD110T</i>	<i>SOD215C</i>	13 em 20 (65) <sup>C</sup>

Níveis de significância: <sup>A</sup>  $P \leq 0,05$ ; <sup>B</sup>  $P \leq 0,01$ ; <sup>C</sup>  $P \leq 0,005$ ; <sup>D</sup>  $P \leq 0,001$ .

Verificou-se uma distribuição uniforme dos genótipos de *P. jirovecii* durante o período em que decorreu o estudo, não se observando nenhuma associação estatística entre os genótipos detectados e os anos, ou a estação do ano, em que as amostras foram recolhidas. No que diz respeito à informação demográfica dos doentes (quadro XXIX), observou-se que o genótipo multilocus (MLG, do inglês *multilocus genotype*) *mt85A/DHFR312T*, quando comparado com os outros MLGs, foi detectado numa frequência mais elevada entre os doentes do sexo feminino (9 isolados, 47%;  $P = 0,034$ ). Foram também observadas associações estatisticamente significativas entre determinadas faixas etárias e SNPs específicos. Assim, observou-se que as amostras de

doentes dos grupos etários I e II estão associadas com os polimorfismos *mt248C* (55 isolados, 66%;  $P = 0,050$ ) e *SOD110C* (21 isolados, 72%;  $P = 0,036$ ), enquanto que as amostras provenientes do grupo etário III estão correlacionadas com os polimorfismos *mt248T* (sete isolados, 70%;  $P = 0,036$ ) e *DHFR312C* (nove isolados, 60%;  $P = 0,020$ ).

No decorrer da análise estatística foram detectadas algumas associações significativas entre determinados parâmetros da infecção e a distribuição de genótipos de *P. jirovecii*. Nos quadros XXX e XXXI, encontram-se resumidas as distribuições das frequências dos SNPs e MLGs mais relevantes, em relação aos parâmetros clínicos recolhidos, no decorrer do estudo.

Com esta análise verificou-se que a detecção de cargas parasitárias baixas é mais frequente nos isolados com *mt85C* (17 isolados, 30%;  $P = 0,021$ ), *SOD110T* (quatro isolados, 21%), *SOD215C* (cinco isolados, 25%) e *DHFR312C* (sete isolados, 47%;  $P = 0,050$ ). Por outro lado, a detecção de cargas parasitárias elevadas é mais comum nos isolados com *mt85A* ou *mt85T* (ambos com sete isolados, 29%), *SOD110C* (nove isolados, 31%), *SOD215T* (10 isolados, 30%) e *DHFR312T* (15 isolados, 27%). É de acrescentar ainda que, cargas parasitárias baixas a moderadas são significativamente mais comuns entre os isolados com *mt85C* (48 isolados, 83%;  $P = 0,050$ ), e que cargas parasitárias moderadas a elevadas são significativamente mais frequentes nos isolados com *DHFR312T* (44 isolados, 80%;  $P = 0,038$ ). Aparentemente, cargas parasitárias baixas parecem ser mais comuns entre os isolados com *mt85C/SOD215C* (quatro isolados, 33%) e *SOD110T/SOD215C* (três isolados, 25%), enquanto que cargas parasitárias mais elevadas parecem ser menos frequentes entre os isolados com esses MLGs (ambos com dois isolados, 17%). No que se refere aos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, os casos com contagens menores que 50 células/mm<sup>3</sup> foram significativamente menos frequentes nos isolados com *mt85C* (27 isolados, 63%;  $P = 0,047$ ) quando comparados com o conjunto dos restantes isolados caracterizados para o SNP *mt85*.

Apesar de ser um parâmetro bastante comum nos casos de infecção por *P. jirovecii*, o quadro clínico compatível com PPc, é menos frequente entre os isolados de doentes com *mt85C* (41 isolados, 71%;  $P = 0,050$ ) do que o conjunto dos isolados com *mt85A* e *mt85T*. Por outro lado, este parâmetro é mais comum entre os isolados de

doentes com *DHFR312T* (49 isolados, 92%) (quadro XXXI). As amostras dos doentes com evolução clínica favorável aparentam estar associadas com os polimorfismos *mt85C* (20 isolados, 87%;  $P = 0,01$ ) e *SOD215C* (14 isolados, 93%;  $P = 0,02$ ), e com os MLGs *mt85C/SOD215C* (11 isolados, 100%;  $P = 0,015$ ) e *SOD110T/SOD215C* (10 isolados, 100%;  $P = 0,032$ ).

**Quadro XXIX.** Distribuição das frequências dos genótipos de *P. jirovecii* mais relevantes, detectados nas secreções pulmonares, em relação à idade e ao género dos doentes englobados no estudo.

SNPs/Genótipos	Género, N (%)		Grupos etários N (%)		
	Masculino	Feminino	Grupo I	Grupo II	Grupo III
<i>mt85C</i>	41 (72)	16 (28)	8 (14)	25 (43)	25 (43)
<i>mt85A</i>	15 (63)	9 (37)	3 (13)	13 (54)	8 (33)
<i>mt85T</i>	18 (75)	6 (25)	5 (21)	10 (42)	9 (37)
<i>mt248C</i>	57 (68)	27 (32)	14 (17)	41 (49)	29 (34) <sup>A</sup>
<i>mt248T</i>	7 (70)	3 (30)	0	3 (30)	7 (70) <sup>A</sup>
<i>CYB516C</i>	24 (73)	9 (27)	2 (6)	19 (58)	12 (36)
<i>CYB516T</i>	7 (78)	2 (22)	1 (11)	3 (33)	5 (56)
<i>CYB838C</i>	26 (74)	9 (26)	3 (9)	18 (51)	14 (40)
<i>CYB838T</i>	7 (78)	2 (22)	0	5 (56)	4 (44)
<i>SOD110C</i>	23 (79)	6 (21)	3 (10)	18 (62)	8 (28) <sup>A</sup>
<i>SOD110T</i>	15 (79)	4 (21)	1 (5)	8 (42)	10 (53)
<i>SOD215T</i>	27 (82)	6 (18)	3 (9)	19 (58)	11 (33)
<i>SOD215C</i>	15 (75)	5 (25)	1 (5)	10 (50)	9 (45)
<i>DHFR312T</i>	36 (65)	19 (35)	10 (18)	29 (53)	16 (29)
<i>DHFR312C</i>	13 (87)	2 (13)	1 (7)	5 (33)	9 (60) <sup>A</sup>
<i>mt85C/SOD215C</i>	10 (83)	2 (17)	0	5 (42)	7 (58)
<i>mt85A/DHFR312T</i>	10 (53)	9 (47) <sup>A</sup>	2 (11)	12 (63)	5 (26)
<i>mt248C/SOD215T</i>	25 (83)	5 (17)	1 (3)	18 (60)	11 (37)
<i>CYB516C/DHFR312T</i>	20 (77)	6 (23)	2 (8)	16 (61)	8 (31)
<i>SOD110C/SOD215T</i>	22 (81)	5 (19)	3 (11)	16 (59)	8 (30)
<i>SOD110T/SOD215C</i>	9 (75)	3 (25)	1 (8)	5 (42)	6 (50)

Níveis de significância: <sup>A</sup>  $P \leq 0,05$ .

Os grupos etários foram definidos do seguinte modo: grupo I (doentes com menos de 30 anos); grupo II (doentes com idades compreendidas entre os 30 e os 39 anos); grupo III (doentes com idade igual ou superior a 40 anos).

**Quadro XXX.** Distribuição das frequências dos genótipos de *P. jirovecii* mais relevantes, no que se refere à carga parasitária e à contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>.

SNPs/Genótipos	Carga parasitária, N (%)			Contagem de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> (células/mm <sup>3</sup> ), N (%)	
	Baixa	Moderada	Elevada	Entre 50 e 200	Menor que 50
<i>mt85C</i>	17 (30) <sup>A</sup>	31 (53)	10 (17) <sup>A</sup>	16 (37)	27 (63) <sup>A</sup>
<i>mt85A</i>	2 (8)	15 (63)	7 (29)	5 (23)	17 (77)
<i>mt85T</i>	5 (21)	12 (50)	7 (29)	3 (16)	16 (84)
<i>mt248C</i>	18 (21)	47 (56)	19 (23)	19 (28)	48 (72)
<i>mt248T</i>	1 (10)	5 (50)	4 (40)	3 (33)	6 (67)
<i>CYB516C</i>	4 (12)	20 (61)	9 (27)	7 (23)	24 (77)
<i>CYB516T</i>	3 (33)	3 (33)	3 (33)	2 (22)	7 (78)
<i>CYB838C</i>	7 (20)	19 (54)	9 (26)	9 (27)	24 (73)
<i>CYB838T</i>	0	5 (56)	4 (44)	0	9 (100)
<i>SOD110C</i>	4 (14)	16 (55)	9 (31)	7 (27)	19 (73)
<i>SOD110T</i>	4 (21)	11 (58)	4 (21)	3 (17)	15 (83)
<i>SOD215T</i>	4 (12)	19 (58)	10 (30)	6 (19)	25 (81)
<i>SOD215C</i>	5 (25)	10 (50)	5 (25)	5 (28)	13 (72)
<i>DHFR312T</i>	11 (20) <sup>A</sup>	29 (53)	15 (27)	12 (24)	37 (76)
<i>DHFR312C</i>	7 (47) <sup>A</sup>	5 (33)	3 (20)	2 (20)	8 (80)
<i>mt85C/SOD215C</i>	4 (33)	6 (50)	2 (17)	3 (27)	8 (73)
<i>mt85A/DHFR312T</i>	2 (11)	12 (63)	5 (26)	4 (22)	14 (78)
<i>mt248C/SOD215T</i>	4 (13)	18 (60)	8 (27)	6 (21)	23 (79)
<i>CYB516C/DHFR312T</i>	3 (12)	16 (61)	7 (27)	6 (24)	19 (76)
<i>SOD110C/SOD215T</i>	4 (15)	15 (55)	8 (30)	6 (24)	19 (76)
<i>SOD110T/SOD215C</i>	3 (25)	7 (58)	2 (17)	2 (18)	9 (82)

Níveis de significância: <sup>A</sup>  $P \leq 0,05$ .

No que diz respeito à distribuição de genótipos em relação à profilaxia e à terapêutica anti-*P. jirovecii* (quadro XXXII), foi observado que *SOD215C* foi significativamente mais frequente nos isolados dos doentes sem regime profilático anti-*P. jirovecii* (18 isolados, 95%;  $P = 0,006$ ). No que se refere aos genes que codificam para as enzimas do ácido fólico, alvos da acção do TMP-SMZ, não se observaram diferenças significativas na distribuição dos SNPs, no que se refere à profilaxia ou à terapêutica. No entanto, os resultados indicam que *DHFR312T* é mais frequente nos doentes com profilaxia instituída (12 isolados, 22%), e *DHPS165G* e

*DHPS171T* (SNPs de genótipos mutantes) são mais frequentes nos doentes com terapêutica instituída (cinco isolados, 83% e seis isolados, 86%, respectivamente).

**Quadro XXXI.** Distribuição das frequências dos genótipos de *P. jirovecii* mais relevantes, no que se refere ao diagnóstico clínico da pneumocistose e à evolução clínica da infecção.

SNPs/Genótipos	Diagnóstico clínico de PPc, N (%)		Evolução clínica, N (%)	
	Compatível	Não compatível	Positiva	Negativa
<i>mt85C</i>	41 (71) <sup>A</sup>	17 (29)	20 (87) <sup>B</sup>	3 (13)
<i>mt85A</i>	20 (83)	4 (17)	13 (68)	6 (32)
<i>mt85T</i>	19 (79)	5 (21)	6 (55)	5 (45)
<i>mt248C</i>	64 (76)	20 (24)	27 (68)	13 (32)
<i>mt248T</i>	8 (80)	2 (20)	5 (71)	2 (29)
<i>CYB516C</i>	26 (79)	7 (21)	20 (74)	7 (26)
<i>CYB516T</i>	8 (89)	1 (11)	5 (56)	4 (44)
<i>CYB838C</i>	28 (80)	7 (20)	22 (71)	9 (29)
<i>CYB838T</i>	8 (89)	1 (11)	4 (57)	3 (43)
<i>SOD110C</i>	21 (72)	8 (28)	13 (65)	7 (35)
<i>SOD110T</i>	14 (78)	4 (22)	12 (75)	4 (25)
<i>SOD215T</i>	24 (73)	9 (27)	16 (64)	9 (36)
<i>SOD215C</i>	16 (80)	4 (20)	14 (93) <sup>A</sup>	1 (7)
<i>DHFR312T</i>	49 (92)	4 (8)	26 (76)	8 (24)
<i>DHFR312C</i>	11 (73)	4 (27)	3 (60)	2 (40)
<i>mt85C/SOD215C</i>	10 (83)	2 (17)	11 (100) <sup>A</sup>	0
<i>mt85A/DHFR312T</i>	16 (84)	3 (16)	12 (75)	4 (25)
<i>mt248C/SOD215T</i>	23 (77)	7 (23)	15 (63)	9 (27)
<i>CYB516C/DHFR312T</i>	22 (85)	4 (15)	18 (78)	5 (22)
<i>SOD110C/SOD215T</i>	20 (74)	7 (26)	13 (65)	7 (35)
<i>SOD110T/SOD215C</i>	9 (75)	3 (25)	10 (100) <sup>A</sup>	0

Níveis de significância: <sup>A</sup>  $P \leq 0,05$ ; <sup>B</sup>  $P \leq 0,01$ .

**Quadro XXXII.** Distribuição das frequências dos genótipos de *P. jirovecii* mais relevantes, no que se refere à profilaxia e terapêutica anti-*P. jirovecii*.

SNPs/Genótipos	Profilaxia anti- <i>P. jirovecii</i> , N (%)		Terapêutica anti- <i>P. jirovecii</i> , N (%)	
	Instituída	Não instituída	Instituída	Não instituída
<i>mt85C</i>	15 (29)	37 (71)	11 (23)	37 (77)
<i>mt85A</i>	6 (27)	16 (73)	2 (10)	19 (90)
<i>mt85T</i>	4 (17)	19 (83)	8 (35)	15 (65)
<i>mt248C</i>	19 (25)	58 (75)	15 (20)	58 (80)
<i>mt248T</i>	7 (70)	3 (30)	3 (33)	6 (67)
<i>CYB516C</i>	7 (22)	25 (78)	25 (81)	6 (19)
<i>CYB516T</i>	0	9 (100)	6 (75)	2 (25)
<i>CYB838C</i>	6 (18)	28 (82)	25 (78)	7 (22)
<i>CYB838T</i>	1 (11)	8 (89)	8 (89)	1 (11)
<i>SOD110C</i>	9 (31)	20 (69)	3 (11)	24 (89)
<i>SOD110T</i>	3 (17)	15 (83)	4 (24)	13 (76)
<i>SOD215T</i>	11 (33)	22 (67)	4 (13)	27 (87)
<i>SOD215C</i>	1 (5)	18 (95) <sup>B</sup>	3 (17)	15 (83)
<i>DHFR312T</i>	12 (22)	42 (78)	10 (19)	43 (81)
<i>DHFR312C</i>	1 (9)	10 (91)	2 (20)	8 (80)
<i>DHPS165A</i>	18 (25)	55 (75)	54 (77)	16 (23)
<i>DHPS165G</i>	1 (17)	5 (83)	5 (83)	1 (17)
<i>DHPS171C</i>	18 (25)	54 (75)	53 (77)	16 (23)
<i>DHPS171T</i>	1 (14)	6 (86)	6 (86)	1 (14)
<i>mt85C/SOD215C</i>	1 (8)	11 (92)	10 (83)	2 (17)
<i>mt85A/DHFR312T</i>	6 (32)	13 (68)	16 (89)	2 (11)
<i>mt248C/SOD215T</i>	9 (30)	21 (70)	24 (86)	1 (14)
<i>CYB516C/DHFR312T</i>	5 (19)	21 (81)	22 (88)	3 (12)
<i>SOD110C/SOD215T</i>	9 (33)	18 (67)	22 (88)	3 (12)
<i>SOD110T/SOD215C</i>	1 (9)	10 (91)	8 (73)	3 (27)

Níveis de significância: <sup>B</sup>  $P \leq 0,01$ .

Procedeu-se à distribuição das frequências dos SNPs e dos MLGs detectados nos isolados dos três grupos de doentes seropositivos para VIH, classificados com base nos parâmetros do diagnóstico clínico, parasitológico e molecular (quadro XXXIII):

- 1) Isolados de doentes com casos confirmados de PPc;
- 2) Isolados de doentes com apresentação atípica de PPc;

3) Isolados de portadores assintomáticos de *P. jirovecii*.

Observou-se que *mt85C* foi significativamente menos frequente nos casos confirmados de PPc (41 isolados, 71%;  $P = 0,050$ ), e que, o polimorfismo *DHFR312C* foi significativamente mais frequente entre os portadores assintomáticos (três isolados, 20%;  $P = 0,030$ ) do que *DHFR312T* (um isolado, 2%;  $P = 0,024$ ).

**Quadro XXXIII.** Distribuição das frequências dos genótipos de *P. jirovecii* mais relevantes, nos três grupos considerados de doentes seropositivos para VIH.

SNPs/Genótipos	Classificação dos casos clínicos, N (%)		
	Casos confirmados de PPc	Casos de PPc com apresentação clínica atípica	Portadores assintomáticos de <i>P. jirovecii</i>
<i>mt85C</i>	41 (71) <sup>A</sup>	10 (17)	7 (12)
<i>mt85A</i>	20 (83)	4 (17)	0
<i>mt85T</i>	19 (79)	3 (13)	2 (8)
<i>mt248C</i>	64 (76)	13 (16)	7 (8)
<i>mt248T</i>	8 (80)	2 (20)	0
<i>CYB516C</i>	26 (79)	6 (18)	1 (3)
<i>CYB516T</i>	8 (89)	0	1 (11)
<i>CYB838C</i>	28 (80)	5 (14)	2 (6)
<i>CYB838T</i>	8 (89)	1 (11)	0
<i>SOD110C</i>	21 (72)	7 (24)	1 (4)
<i>SOD110T</i>	15 (79)	3 (16)	1 (5)
<i>SOD215T</i>	24 (73)	8 (24)	1 (3)
<i>SOD215C</i>	16 (80)	3 (15)	1 (5)
<i>DHFR312T</i>	49 (89)	5 (9)	1 (2) <sup>A</sup>
<i>DHFR312C</i>	11 (73)	1 (7)	3 (20) <sup>A</sup>
<i>mt85C/SOD215C</i>	10 (84)	1 (8)	1 (8)
<i>mt85A/DHFR312T</i>	16 (84)	3 (16)	0
<i>mt248C/SOD215T</i>	23 (77)	6 (20)	1 (3)
<i>CYB516C/DHFR312T</i>	22 (85)	4 (15)	0
<i>SOD110C/SOD215T</i>	20 (74)	6 (22)	1 (4)
<i>SOD110T/SOD215C</i>	9 (75)	2 (17)	1 (8)

Níveis de significância: <sup>A</sup>  $P \leq 0,05$ .

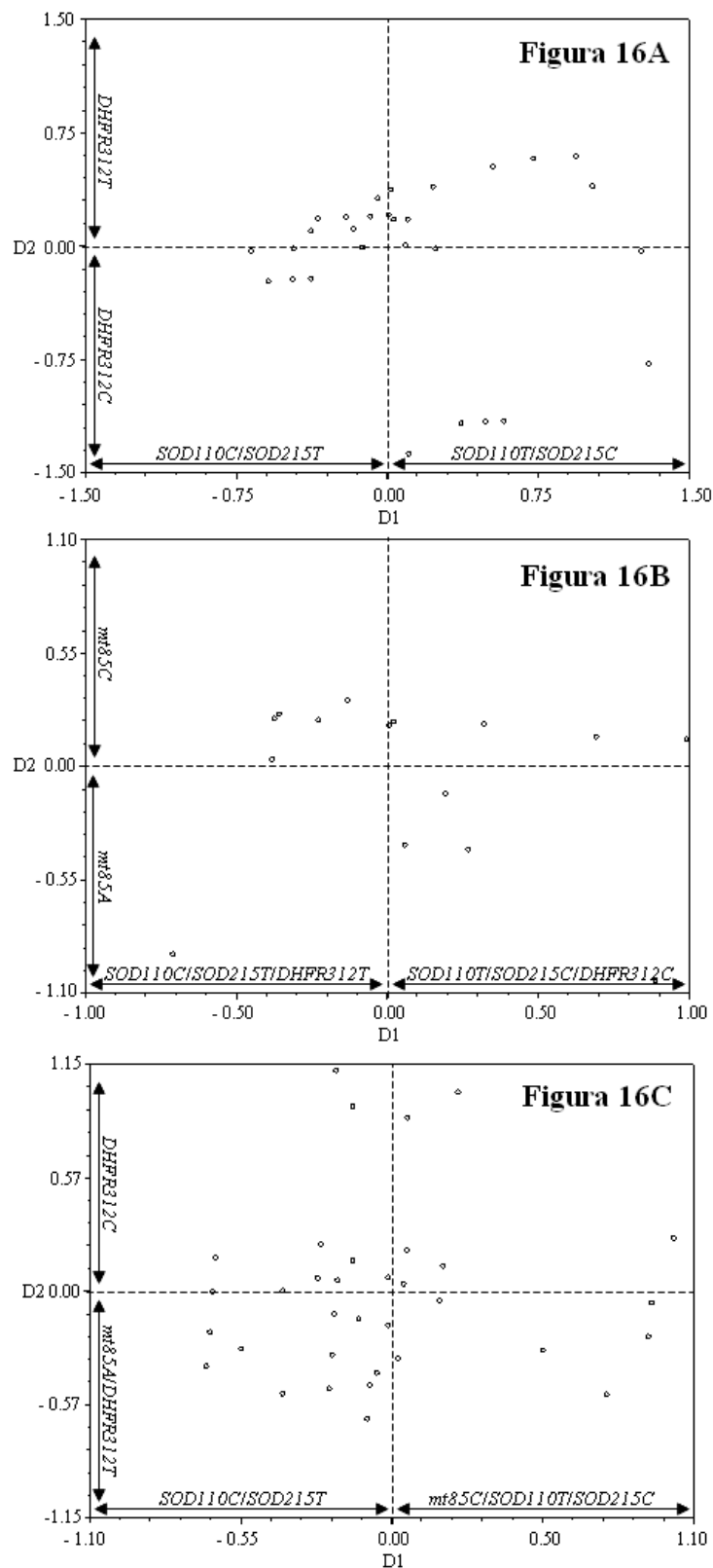


### 11.5.3. Análise de componentes principais

Com o objectivo de explorar os dados obtidos, quer a nível de caracterização genética de SNPs, quer a nível de correlações entre os SNPs e os parâmetros clínicos da infecção, foi efectuada uma PCA. Os resultados desta análise permitiram a confirmação de algumas associações. Os três gráficos da PCA, considerados mais informativos estão representados na figura 16. A figura 16A demonstra que cargas parasitárias moderadas a elevadas foram mais frequentes entre os isolados dos doentes com *DHFR312T* (D2). Na figura 16B podemos observar que *mt85C* (D2) foi mais comum nos isolados de doentes com apresentação clínica atípica de PPc (detecção de *P. jirovecii* por IFI/AcM e por PCR *nested*, mas com quadro clínico não compatível com PPc). A figura 16C demonstra que os casos confirmados de PPc (detecção de *P. jirovecii* por IFI/AcM, ou, por PCR *nested*, com quadro clínico compatível com PPc) são mais comuns entre os isolados de doentes com *SOD110C/SOD215T* (D1).

### 11.5.4. Estudo da distribuição de genótipos e critérios de clonalidade

Apesar do recente esforço de aplicação de técnicas de biologia molecular nos estudos de *P. jirovecii*, muitas questões relacionadas com a biodiversidade deste microrganismo permanecem por esclarecer. Diversos aspectos da genética da população de *P. jirovecii*, tais como, os seus modos e estratégias de reprodução e replicação, localização (reservas no ambiente), dispersão e modos de transmissão entre hospedeiros, não podem ser estudadas por observação directa, pois a inexistência de um processo sustentado de cultivo de *P. jirovecii*, bem como a sua especificidade, dimensão, localização e biologia, não o permitem. Assim, todos estes parâmetros têm de ser analisados por métodos, designados por indirectos, que implicam o uso de marcadores moleculares polimórficos e a variação desses polimorfismos entre subgrupos de indivíduos predefinidos, numa determinada população de *P. jirovecii*.



**Figura 16.** Representação gráfica das três análises de componentes principais mais informativas. (A) Distribuição dos isolados com cargas parasitárias moderadas a

elevadas nos SNPs de *P. jirovecii* detectados no decorrer do estudo e considerados como os mais relevantes. A primeira dimensão principal (D1), que explica 42% da variância total, está correlacionada com os SNPs *SOD110* e *SOD215*. A segunda dimensão principal (D2), que explica 25% do total da variância, está correlacionada com o SNP *DHFR312*. (B) Distribuição dos isolados de doentes com apresentação clínica atípica de PPc nos SNPs mais relevantes de *P. jirovecii*. A primeira dimensão principal (D1), que explica 51% da variância total, está correlacionada com os SNPs *SOD110*, *SOD215* e *DHFR312*. A segunda dimensão principal (D2), que explica 19% do total da variância, está correlacionada com o SNP *mt85*. (C) Distribuição dos isolados de doentes com casos confirmados de PPc nos SNPs mais relevantes de *P. jirovecii*. A primeira dimensão principal (D1), que explica 36% da variância total, está correlacionada com os SNPs *mt85*, *SOD110* e *SOD215*. A segunda dimensão principal (D2), que explica 25% do total da variância, está correlacionada com os SNPs *mt85* e *DHFR312*.

A estrutura da população e o modo de reprodução e replicação de agentes patogénicos, são entendidos, por diversos autores, como conceitos fundamentais, pois estão implicados em fenómenos biológicos com consequências na epidemiologia da transmissão das doenças, sendo o seu conhecimento crucial no campo da investigação para o tratamento, avaliação de resistência a fármacos e identificação de subtipos mais virulentos, e no campo clínico para uma prevenção, controlo e combate mais eficazes às doenças [Nadler 1995; Tibayrenc 1999; de Meeûs T. *et al.* 2007].

Um marcador genético compreende uma porção de ácidos nucleicos (ex. DNA) ou de produto de expressão de uma porção de ácidos nucleicos (ex. proteína) de um determinado organismo. Para que possam ser retiradas inferências biológicas, a variação de uma determinada porção de DNA, ou do seu produto, tem de ser estudada entre indivíduos de uma mesma população. Com o objectivo de investigar desvios à distribuição aleatória de genótipos de *P. jirovecii*, o teste combinatório d1 (*vide* Anexo IV) foi aplicado numa população de microrganismos isolados de doentes seropositivos para VIH. Devido a evoluir rapidamente e a demonstrar recombinação genética limitada, independente do DNA nuclear, o DNA mitocondrial é uma molécula bastante útil em estudos de variabilidade genética e epidemiológicos. No entanto,

trata-se de um marcador inapropriado para estudos baseados em genética de populações, pois é dependente da estrutura da população, é herdado de forma uniparental e a dimensão efectiva destes marcadores na população é sempre difícil de determinar (dependente da estratégia de reprodução e do número de cópias por organismo). Assim, o DNA mitocondrial pode não ser neutro e a sua distribuição pode não depender apenas de processos demográficos e geográficos. Para ser considerado informativo, um determinado *locus* tem de ser variável, ou seja, os seus alelos têm de variar entre indivíduos da mesma população [Tibayrenc *et al.* 1990; Tibayrenc *et al.* 1991; de Meeûs T. *et al.* 2007]. Desta forma, os genes *mtLSU rRNA* e *CYB* (DNA mitocondrial), os genes *TRR1* e *TS* (com variação limitada ou mesmo nula), e o gene *KEX1* e a região *UCS* (com número limitado de isolados genotipados) não foram considerados no cálculo do teste recombinatório d1.

O teste d1 foi calculado com os resultados combinados da genotipagem dos quatro marcadores polimórficos nucleares *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *DHFR* e *DHPS*. A genotipagem multilocus destes quatro *loci* permite a discriminação teórica de 108 genótipos. No decorrer do presente trabalho, a genotipagem multilocus foi completada com sucesso em 33 isolados. Vinte e quatro isolados produziram um total de seis sequências distintas, correspondendo a infecções com apenas um MLG de *P. jirovecii*. Os restantes nove isolados, onde foram identificados oito sequências distintas, apresentaram uma complexidade de sequências compostas por dois alelos, em, pelo menos, uma das quatro regiões genómicas, revelando co-infecções com a presença de dois ou mais MLGs putativos. No total, foram identificados 14 MLGs de *P. jirovecii*, cujas frequências variaram entre 3 e 30%. As características genéticas dos MLG, o número de isolados que partilham um determinado MLG, as frequências observadas e esperadas dos MLGs, assumindo recombinação aleatória entre *loci*, bem como os resultados do teste d1, encontram-se descritos no quadro XXXIV. Estes resultados sugerem um desvio significativo à recombinação aleatória entre genótipos para o MLG E.

**Quadro XXXIV.** Resultados do cálculo do teste recombinatório d1 para os MLGs de *P. jirovecii* isolado de doentes seropositivos para VIH. Os genes nucleares *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *DHFR* e *DHPS* foram utilizados como marcadores em 33 isolados.

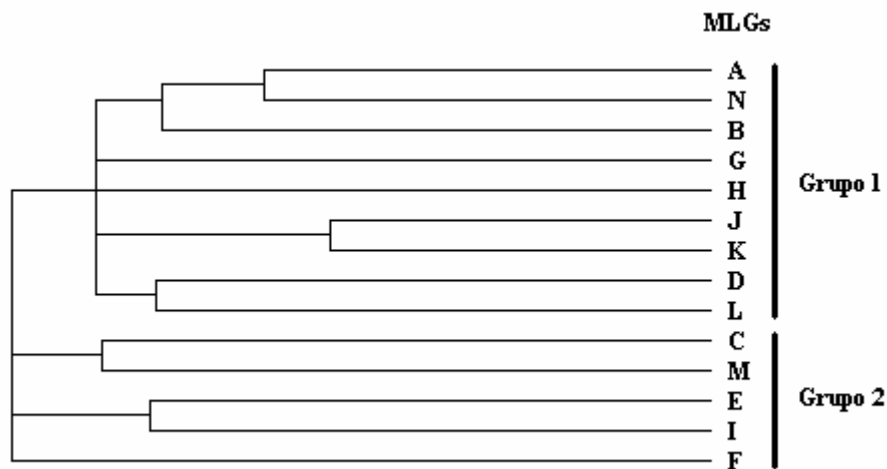
MLGs	SNPs identificados nos quatro <i>loci</i>				Número de isolados, N (%)	Frequência		Teste d1
	(base nucleotídica)					Observada	Esperada	
	<i>SOD</i> (110/215)	<i>B TUB</i> (238/327)	<i>DHFR</i> (312/381)	<i>DHPS</i> (165/171)				
A	C/T	A/G	T/C	A/C	10 (30)	0.303	0.193	0.089
B	C/T	G/G	T/C	A/C	6 (18)	0.182	0.010	0.105
C	T/C	A/G	T/C	A/C	6 (18)	0.182	0.193	NA
D	C/C	A/G	T/C	A/C	5 (15)	0.152	0.064	0.058
E	T/C	A/G	C/C	A/C	5 (15)	0.152	0.039	0.008 <sup>B</sup>
F	T/C	G/G	T/C	A/C	3 (9)	0.091	0.010	0.653
G	T/T	G/G	T/C	A/C	3 (9)	0.091	0.033	0.096
H	T/T	A/G	T/C	A/C	3 (9)	0.091	0.064	0.359
I	T/C	G/G	C/C	A/C	2 (6)	0.061	0.020	0.140
J	C/T	A/G	T/C	G/T	1 (3)	0.030	0.008	NA
K	T/C	G/G	T/C	G/T	1 (3)	0.030	0.004	NA
L	C/C	G/G	T/C	A/C	1 (3)	0.030	0.033	NA
M	T/C	A/T	T/C	A/C	1 (3)	0.030	0.006	NA
N	C/T	A/G	C/C	A/C	1 (3)	0.030	0.039	NA

Níveis de significância: <sup>B</sup>  $P \leq 0,01$ . Resultado que sugere um desvio à distribuição panmítica.

O teste d1 consiste numa análise combinatória que fornece um valor ( $P$ ) para cada MLG representado mais do que uma vez na amostra em estudo. Os resultados foram considerados significativos para valores de  $P$  iguais ou inferiores a 0,05. NA (não aplicado), corresponde a casos onde o teste d1 não foi realizado por causa das frequências esperadas serem mais elevadas do que as frequências observadas, ou, por causa dos MLG estarem representados apenas uma vez na amostra da população em estudo.

A relação entre os diferentes MLGs, considerando os quatro marcadores nucleares (*SOD*,  $\beta$  *TUB*, *DHFR* e *DHPS*), foi também estudada e quantificada, aplicando o método de *Neighbour Joining* (NJ) à matriz de distâncias, que corresponde às distâncias entre os pares de sequências resultantes da análise por alinhamento múltiplo das sequências dos MLGs [Saitou & Nei 1987]. Os resultados desta análise permitiram a construção de um dendrograma (figura 17). No dendrograma NJ verifica-se a presença de dois grupos ou *clusters*, definidos principalmente por dois loci: *SOD* e *DHPS*. No presente estudo, foi detectado um total de quatro alelos para o gene

*SOD* (*SOD110C/SOD215T*, *SOD110T/SOD215C*, *SOD110T/SOD215T* e *SOD110C/SOD215C*) e de três para o gene *DHPS* (*DHPS165A/DHPS171C*, *DHPS165A/DHPS171T*, *DHPS165G/DHPS171T*). O *cluster* definido como grupo 1 inclui MLGs com sequências que compreendem os quatro genótipos *SOD* e dois genótipos *DHPS*. O *cluster* definido como grupo 2 engloba todos os genótipos com a combinação de sequências *SOD110T/SOD215C* e *DHPS165A/DHPS171C*.



**Figura 17.** Dendrograma das relações entre os MLGs de *P. jirovecii*, construído com base nos polimorfismos dos marcadores nucleares *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *DHFR* e *DHPS*. Os MLGs foram agrupados em dois *clusters*: grupo 1 (nove MLGs) que engloba diversos genótipos; e grupo 2 (cinco MLGs) que inclui todos os isolados com a combinação de sequências *SOD110T/SOD215C* e *DHPS165A/DHPS171C*.

No que se refere ao MLG E, não foi detectada nenhuma associação significativa entre este genótipo e os parâmetros clínicos dos doentes. Os resultados obtidos permitiram verificar que os MLGs do grupo 1 do dendrograma foram significativamente mais comuns entre os isolados de doentes com idades compreendidas entre os 30 e os 39 anos (grupo etário II) (82%,  $P = 0,049$ ), e que os MLGs do grupo 2 do dendrograma foram significativamente menos frequentes nesse mesmo grupo etário (18%,  $P = 0,049$ ).

Sabendo que *SOD110C* demonstrou estar estatisticamente associado com *SOD215T*, bem como, *SOD110T* com *SOD215C*, a relação entre os SNPs *SOD110* e

*SOD215* foi investigada pelo programa bioinformático SNPStats, relativamente ao fenómeno de desequilíbrio de ligação. Os resultados desta análise demonstraram, claramente, que estes dois SNPs se encontram em desequilíbrio de ligação ( $P = 0,00001$ ).

## 11.6. Discussão dos resultados

Os recentes avanços na biologia molecular de *P. jirovecii* permitiram produzir informação útil no que diz respeito a importantes questões relacionadas com a caracterização molecular e a propagação geográfica de genótipos específicos, em especial, aqueles que, de algum modo, poderão estar relacionados com potenciais mecanismos de resistência a fármacos, diferentes graus de severidade e modos de transmissão da infecção. A genotipagem multilocus de *P. jirovecii* permite a caracterização simultânea de SNPs em diversos *loci*, disponibilizando maior quantidade de informação do que a genotipagem simples de apenas um *locus*. No presente estudo, foram caracterizados 10 *loci* de *P. jirovecii* isolado de doentes seropositivos para VIH, nos quais foi detectado um total de 23 SNPs. A diversidade genética, as frequências de distribuição de genótipos e a relação entre os genótipos observados e os dados demográficos e os parâmetros clínicos dos doentes englobados no estudo, foram investigadas. Alguns SNPs e MLGs demonstraram estar associados a determinadas características demográficas ou a parâmetros clínicos específicos.

### 11.6.1. Variabilidade e distribuição dos genótipos de *Pneumocystis jirovecii*

A distribuição das frequências alélicas do gene *mtLSU rRNA* mostrou ser idêntica à distribuição observada num estudo anterior, também envolvendo doentes Portugueses, onde *mt85C* foi o SNP mais frequente, seguido de *mt85A* e *mt85T* [Esteves *et al.* 2008]. De forma idêntica, o padrão de distribuição de genótipos de *mtLSU rRNA* em estudos realizados nos E.U.A. e no Reino Unido, foi semelhante ao detectado no decorrer do presente trabalho [Beard *et al.* 2000; Miller *et al.* 2005a]. Porém, em estudos realizados em *P. jirovecii* isolado de doentes Espanhóis, verificou-se um padrão de distribuição diferente para os alelos deste *locus*, no qual, *mt85C* é o SNP mais comum, mas de forma inversa ao que sucede nos isolados da população portuguesa, *mt85T* é o segundo SNP mais comum e *mt85A* é o terceiro SNP mais frequente [Montes-Cano *et al.* 2004; Medrano *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008]. Estas diferenças sugerem a variação geográfica dos alelos de *P. jirovecii*. Assim, factores epidemiológicos inerentes às regiões estudadas, como por exemplo, características geográficas, demográficas e climáticas poderão, eventualmente, influenciar a transmissão e a circulação dos diferentes genótipos de *P. jirovecii*.



Tendo em conta que os doentes englobados no presente estudo não foram expostos à atovaquona, a incidência de genótipos mutantes, no gene *CYB*, foi inesperadamente mais elevada (22%) do que em estudos anteriores realizados noutras regiões geográficas, considerando sempre grupos de doentes não expostos à atovaquona (7% nos E.U.A. e 3% no Japão) [Kazanjian *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2002b]. Mutações na região que codifica para a Q<sub>0</sub> de *P. jirovecii*, isolado de doentes a receberem profilaxia com atovaquona, foram já descritas por outros autores [Walker *et al.* 1998; Kazanjian *et al.* 2001]. No entanto, as sequências polimórficas com mutações nos aminoácidos 189 e 280, detectadas no presente trabalho, não se encontram na região Q<sub>0</sub>, não interferindo, por isso, na ligação da ubiquinona ao citocromo *b* [Esteves *et al.* 2010b].

Com base na variabilidade genética das posições 110 e 215 do gene *SOD*, foram detectados quatro genótipos distintos entre os 46 isolados estudados com sucesso para este locus: *SOD110C/SOD215T* (20 isolados, 44%), *SOD110T/SOD215C* (11 isolados, 24%), *SOD110T/SOD215T* (cinco isolados, 11%), *SOD110C/SOD215C* (dois isolados, 4%) e mistura de genótipos em oito isolados (17%). A presença dos genótipos *SOD110T/SOD215T* e *SOD110C/SOD215C* na população estudada, demonstrou ser um dado interessante, pois, estes dois genótipos, apesar de já terem sido descritos por outros autores, não foram detectados em estudos recentes, realizados em *P. jirovecii* isolado em Londres, Reino Unido e Harare, Zimbabué, onde apenas os genótipos *SOD110C/SOD215T* e *SOD110T/SOD215C* foram detectados [Denis *et al.* 2000; Wakefield *et al.* 2003; Miller *et al.* 2003a; Miller *et al.* 2005a; Miller *et al.* 2005b]. Estes resultados apontam para diferenças na distribuição de genótipos entre organismos de *P. jirovecii* isolados em Lisboa, Portugal e nas outras duas cidades acima referidas, sugerindo, mais uma vez, a existência de diferenças alélicas entre isolados de *P. jirovecii* de diferentes populações geográficas.

Os resultados obtidos para o gene *TRR1* são consistentes com o facto do local de ligação do NADPH ser uma região altamente conservada nas tiorredoxinas reductases. A forma reduzida da tiorredoxina funciona como um importante dador de electrões em diversos processos bioquímicos. Devido a estas características, foi sugerido por outros autores, que a TRR de *P. jirovecii* possa ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novos fármacos [Kutty *et al.* 2003].

No que diz respeito ao gene *TS*, apenas foi detectado o genótipo selvagem, não se observando nenhum SNP. De forma idêntica, num estudo realizado em isolados de *P. jirovecii* em Paris, França e Roma, Itália, somente a sequência selvagem foi detectada. Como este gene *housekeeping* codifica para uma enzima altamente conservada, os resultados obtidos confirmam que o gene *TS* não é um *locus* com potencial para a distinção de subtipos de *P. jirovecii*. No entanto, poderá ser um marcador útil na caracterização de *Pneumocystis* isolados de diferentes espécies de hospedeiros [Mazars *et al.* 1995; Latouche *et al.* 1997a].

Os genótipos  $\beta$  *TUB282G* e  $\beta$  *TUB282A* foram previamente descritos em *P. jirovecii* isolado de doentes seropositivos para VIH, nos E.U.A. e na Suíça [Edlind *et al.* 1992; Hauser *et al.* 1997b]. Um outro estudo demonstrou uma frequência de 48%, para ambos os SNPs, em isolados de *P. jirovecii* em Itália [Volpe *et al.* 2001]. De modo diferente, no presente estudo,  $\beta$  *TUB282A* foi detectado com uma frequência de 66% e  $\beta$  *TUB282G* com uma frequência de 27%. Novamente, as diferenças observadas nos padrões de distribuição alélica sugerem variações na distribuição geográfica de clones de *P. jirovecii*.

No presente estudo, a distribuição alélica do gene *DHFR* demonstrou ser semelhante ao observado em estudos anteriores, realizados em Portugal, em populações de doentes imunocomprometidos [Costa 2006; Costa *et al.* 2006a; Costa *et al.* 2006b]. Nesses trabalhos, as frequências do polimorfismo sinónimo *DHFR312C* foram determinadas num intervalo entre 21 e 28%, idênticas à frequência observada no decorrer do presente estudo, para este SNP (21%). De um modo geral, o polimorfismo sinónimo da base 312 parece ser a variação mais frequente, também, em *P. jirovecii* isolado noutras regiões geográficas, como é o caso do Japão, E.U.A., Suíça e França [Takahashi *et al.* 2002a; Takahashi *et al.* 2002b; Nahimana *et al.* 2004]. Assim, aparentemente, não se verificam alterações relevantes nos perfis de distribuição de frequências do principal polimorfismo do gene *DHFR*, quer temporalmente, quer geograficamente. Porém, um estudo recente, realizado em isolados de *P. jirovecii* em Banguecoque, Tailândia, demonstrou uma frequência bastante mais elevada deste SNP silencioso (61%), o que poderá sugerir, potenciais variações na distribuição geográfica de clones de *P. jirovecii* [Siripattanapipong *et al.* 2008].

Os organismos mutantes para o gene *DHPS* foram detectados em frequências relativamente baixas (sete em 83 isolados, 8%), confirmando o declínio destas mutações nos isolados de *P. jirovecii* em Portugal. Esta distribuição de frequências de genótipos do gene *DHPS* é idêntica às frequências detectadas, em estudos recentes realizados no nosso país (entre 3 e 7%) [Costa *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008]. Num estudo, datado de 2003, foi observada, em Portugal, uma frequência de 28% para os mutantes do gene *DHPS* [Costa *et al.* 2003]. As amostras de secreções pulmonares utilizadas nesse estudo, foram recolhidas entre 1994 e 2001, ou seja, parte delas foram obtidas antes da implementação da HAART (implementada em 1996), durante um período em que a quimioprofilaxia anti-*P. jirovecii* com fármacos da família das sulfas (estabelecida no início da década de 90 do século passado) era generalizada. Ao contrário, os outros dois estudos, bem como o presente, abrangem amostras recolhidas a partir do ano de 2001, altura em que já se verificava um decréscimo no uso da profilaxia anti-*P. jirovecii*, devido à implementação da HAART. Em Espanha, três estudos recentes, apresentaram resultados díspares. Assim, as frequências de mutantes para os codões 55 e 57 foram de 33% (2001-2003), 22% (2001-2004) e 4% (2000-2004), conforme o estudo [Montes-Cano *et al.* 2004; Alvarez-Martinez *et al.* 2008; Esteves *et al.* 2008]. Alguns destes resultados, também poderão apontar para um possível decréscimo destas mutações em *P. jirovecii* isolado em Espanha. Noutros países europeus, as frequências de mutantes nos resíduos aminoacídicos 55 e 57 também têm vindo a baixar, como são os casos do Reino Unido, com um decréscimo de 36% (1992-1993) para 17% (2000-2001), da França, também com um decréscimo de 36% (1993-1996) para 17% (1998-2001) e da Itália, com uma baixa de mutantes de 35% (1992-1997) para 9% (1994-2004) [Visconti *et al.* 2001; Latouche *et al.* 2003; Nahimana *et al.* 2003; Miller *et al.* 2003b; Valerio *et al.* 2007]. Em contraste com estudos realizados nos E.U.A., onde a frequência de mutantes se encontra entre os 40% (1983-2001), os 43% (1991-1999), os 69% (1995-1998 e 1996-1999) e os 81% (1997-2002), conforme o estudo, os isolados de *P. jirovecii* da população portuguesa demonstram uma frequência bastante mais baixa para os genótipos mutantes [Huang *et al.* 2000; Kazanjian *et al.* 2000; Beard *et al.* 2000; Kazanjian *et al.* 2004; Crothers *et al.* 2005]. Os resultados confirmam um declínio destas mutações em Portugal, que também acompanha um decréscimo a nível Europeu, podendo este facto ser a consequência do decréscimo no uso de profilaxia

anti-*P. jirovecii* com sulfas, após a introdução da HAART [Helweg-Larsen *et al.* 1999; Morris *et al.* 2004; Costa *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008; Matos & Esteves 2010a]. Estudos efectuados em países em vias de desenvolvimento, onde o uso de sulfas é bastante limitado, também demonstram baixas frequências de mutantes do gene *DHPS* de *P. jirovecii*, como é o caso da China (entre 0 e 7%), Zimbabué (7%), África do Sul (entre 2 e 13%), Tailândia (12%) e Brasil (0%) [Miller *et al.* 2003b; Zar *et al.* 2004; Kazanjian *et al.* 2004; Robberts *et al.* 2005; Wissmann *et al.* 2006; Siripattanapipong *et al.* 2008; Li *et al.* 2009]. Provavelmente, as diferenças no uso das sulfas para profilaxia anti-*P. jirovecii* poderá ser um factor determinante para as variações observadas na ocorrência de mutantes para o gene *DHPS*, quer a nível temporal, quer a nível geográfico. Considerando estes dados, coloca-se a hipótese de que estas mutações, específicas do gene *DHPS*, podem ter impacto a nível da estrutura da proteína envolvida, sendo importantes para que o parasita resista aos efeitos daquela família de fármacos. Contudo, estas alterações moleculares podem conduzir a rearranjos estruturais, que na ausência do fármaco, podem revelar-se desvantajosos, ao aumentar, por exemplo, os custos de competição (*fitness*) dos clones mutantes, tal como acontece para outros microrganismos, em situações semelhantes [Hastings & Donnelly 2005; Walliker *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008].

O gene *KEX1* foi sequenciado com sucesso em 35% dos isolados estudados. Este valor, relativamente baixo, pode ter sido consequência de baixas cargas parasitárias em algumas das amostras não amplificadas, ineficiência das condições experimentais da metodologia de PCR aplicada, ou resultado do gene *KEX1* ser um gene de cópia única no genoma do microrganismo, dificultando a reacção de amplificação desta região de DNA nuclear. Apesar de terem sido detectados quatro SNPs na sequência *KEX1*, nenhum foi considerado relevante (1 isolado cada, 4%). Um novo polimorfismo (*KEX1543A*) não sinónimo, no aminoácido 277, foi detectado na vizinhança do domínio catalítico que compreende os resíduos D<sup>190</sup>, H<sup>228</sup> e S<sup>400</sup> (ácido aspártico na posição 190, histidina na posição 228 e serina na posição 400) [Esteves *et al.* 2009]. Enquanto estes resíduos aminoacídicos aparentam ser locais conservados, a posição 277 demonstra ser variável entre as diversas proteases *kexin-like* de *Pneumocystis* isolados de diferentes espécies de hospedeiros [Kutty & Kovacs 2003]. Todos estes dados vêm ao encontro da hipótese de que a protease *kexin-like* de *P. jirovecii* é uma proteína conservada, com

importantes funções celulares, especialmente na componente de interacção parasita-hospedeiro, como por exemplo o processamento de proteínas que mantêm a integridade da superfície celular e as propriedades antigénicas do microrganismo, como as MSGs. Tudo indica que estas proteases têm funções de processamento endoproteolítico, clivando resíduos aminoacídicos de pró-proteínas, gerando com a sua acção proteínas biologicamente activas. Estas características poderão fazer com que esta protease possa ser explorada, em futuros estudos, como um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos [Lugli *et al.* 1999; Stringer & Keely 2001; Kutty & Kovacs 2003; Esteves *et al.* 2009].

A técnica de sequenciação directa permitiu confirmar a presença de três tipos de sequências de repetição, no intrão da região *UCS*, cada uma composta por 10 nucleótidos, diferenciadas pelas variações na primeira e quarta base [Kutty *et al.* 2001; Esteves *et al.* 2009]. O número de sequências de repetição, por isolado, variou entre os três e os quatro, com a combinação 1/2/3 a ser a mais comum (73%). Aparentemente, a distribuição das sequências de repetição, da região *UCS* de *P. jirovecii*, detectada em Portugal, é idêntica à observada por Ma *et al.* 2002, num estudo que englobou isolados provenientes dos E.U.A., Itália e Holanda [Ma *et al.* 2002]. Apesar de nesse estudo terem sido detectadas entre duas e seis sequências de repetição, por isolado, o padrão mais comum consistiu em três sequências de repetição, numa frequência (63%) idêntica à detectada no presente trabalho. A determinação dos padrões das sequências de repetição da região *UCS* pode ser útil na genotipagem de *P. jirovecii*, como previamente sugerido por outros autores [Kutty *et al.* 2001]. A região *UCS* está, não só envolvida com a regulação da expressão das MSGs, mas também, a cadeia de aminoácidos por ela codificada, é responsável pelo direccionamento da proteína imatura para o retículo endoplasmático, para posterior processamento. A variação do número de sequências de repetição poderá, eventualmente, interferir na expressão das MSGs, tal como acontece para genes semelhantes de outros microrganismos [Wada & Nakamura 1996; Sunkin *et al.* 1998; Kutty *et al.* 2001; Kutty *et al.* 2008; Esteves *et al.* 2009]. Esta relação deverá ser tida em conta em futuras investigações. No entanto, numa abordagem multilocus, quando se pretende correlacionar dados demográficos ou parâmetros clínicos da infecção com genótipos específicos, a caracterização destas regiões revela-se pouco útil, pois aumenta

consideravelmente o número de MLGs, tornando difícil estabelecer associações. Para além da análise às sequências de repetição, foram também detectados dois novos SNPs no intrão da região *UCS*, diferentes dos descritos no estudo de Ma *et al.* 2002. No entanto, a taxa de sucesso de sequenciação para este *locus* foi relativamente baixa (33%). Novamente, as baixas cargas parasitárias em algumas das amostras não amplificadas, a ineficiência das condições experimentais da metodologia de PCR, ou o facto de se tratar de uma sequência de cópia única, poderão ser as causas prováveis para o insucesso da reacção de amplificação desta região de DNA nuclear.

A variação das sequências detectadas nos genes *mtLSU rRNA* e *CYB* foi superior à variação detectada para os restantes *loci*. Estas diferenças devem-se, provavelmente, ao facto das taxas de polimorfismo serem reconhecidamente mais elevadas no DNA mitocondrial do que no DNA do núcleo da célula [Kazanjian *et al.* 2001; Kang & Hamasaki 2003]. A presença de múltiplos genótipos no mesmo isolado pode ser explicada pela existência de diferentes genomas mitocondriais na mesma célula de *P. jirovecii*. Como alternativa, organismos heterozigóticos, ou mesmo, organismos geneticamente diferentes, poderão infectar um único hospedeiro, sugerindo que nem todas as infecções são produzidas por um único clone de *P. jirovecii*. A detecção de diferentes genótipos durante o mesmo episódio de pneumocistose, em três doentes, reforça a hipótese de que subtipos de *P. jirovecii* geneticamente distintos poderão estar presentes. Estes resultados podem ser consequência de infecções mistas, em conjunto com uma recolha de secreções pulmonares onde não estão sempre representados todos os subtipos do microrganismo, ou ainda, consequência de uma incapacidade da metodologia aplicada em revelar a presença de subtipos que constituem pequenas fracções do total de organismos na amostra [Lu *et al.* 1994; Olsson *et al.* 1998; Matos *et al.* 2003b; Esteves *et al.* 2008]. A mudança dos genótipos mais representativos, entre a primeira e a segunda amostra, detectada através de sequenciação directa, demonstrou que populações heterogéneas de *P. jirovecii* podem infectar um organismo hospedeiro e que as proporções dos subtipos genéticos de *P. jirovecii* podem ser alteradas, durante o mesmo episódio de PPc. A co-infecção é, sem dúvida, um factor importante a ter em conta na dinâmica de transmissão da pneumocistose [Olsson *et al.* 1998; Hauser *et al.* 2001a; Esteves *et al.* 2010a; Esteves *et al.* 2010b].

### 11.6.2. Relação entre os genótipos de *Pneumocystis jirovecii* e os parâmetros da infecção

A genotipagem multilocus, levada a cabo no presente trabalho, permitiu detectar algumas associações estatisticamente significativas entre genótipos específicos e alguns parâmetros da infecção por *P. jirovecii*. O SNP na posição 85 do gene *mtLSU rRNA* foi detectado frequentemente. A presença de uma citosina nesta posição foi associada com cargas parasitárias baixas a moderadas, com um maior número de casos de PPc que não preencheram os critérios do diagnóstico clínico desta doença e com evolução clínica favorável. Quando comparado com os outros SNPs, verificou-se menor incidência de *mt85C* nos casos com contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>, e maior incidência, deste alelo, nos casos com apresentação clínica atípica de PPc e também nos portadores assintomáticos. Apesar de não terem sido estabelecidos resultados estatisticamente significativos, entre os casos com *mt85A* e *mt85T* e os dados clínicos, estes alelos foram mais frequentes nos isolados de doentes com cargas parasitárias elevadas, com contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferior a 50 células/mm<sup>3</sup>, com diagnóstico clínico compatível com PPc, com evolução clínica desfavorável e nos casos confirmados de pneumocistose. Estes resultados sugerem que *mt85C*, ao contrário de *mt85A* e de *mt85T*, pode, de alguma forma, estar relacionado com casos menos severos de pneumocistose. Sabe-se que a variação de nucleótidos pode influenciar a estrutura secundária do rRNA, implicando alterações na conformação do ribossoma e na sua actividade [Noller 1984; Esteves *et al.* 2010a]. Desta forma, podemos estar perante um caso, onde a natureza do nucleótido da base 85 do gene *mtLSU rRNA* pode interferir no rearranjo estrutural da subunidade grande do ribossoma mitocondrial, influenciando o fenómeno de transcrição.

O polimorfismo da base 248 do gene *mtLSU rRNA* foi claramente menos frequente do que o SNP na base 85, sendo que nenhuma associação importante foi detectada entre *mt248C* ou *mt248T* e os parâmetros clínicos da infecção.

Os SNPs detectados nas posições 516 e 838 do gene *CYB* foram reconhecidos como relevantes, pois foram detectados com frequências de 16% e 20%, respectivamente. Nem o polimorfismo silencioso *CYB516T*, nem o polimorfismo não sinónimo *CYB838T*, demonstraram estar estatisticamente associados a parâmetros da infecção por *P. jirovecii*. Porém, verificou-se que *CYB838T* foi mais frequente entre os

casos com cargas parasitárias moderadas a elevadas e apenas foi detectado nos casos com contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>. Observou-se também que, a evolução clínica favorável foi mais frequente nos casos com os genótipos selvagens (*CYB516C* e *CYB838C*). No decorrer do presente estudo, a frequência de mutações no gene *CYB* (22%), foi surpreendentemente superior à frequência de mutações no gene *DHPS* (8%). A maior incidência no uso de TMP-SMZ, em detrimento da atovaquona, para profilaxia e terapêutica anti-*P. jirovecii*, fazia esperar o resultado contrário. No entanto, as mutações detectadas no presente estudo, para o gene *CYB*, não se encontram no local Q<sub>0</sub>, o que vem ao encontro do facto da população em estudo não ter sido exposta à atovaquona. Aparentemente, poderão existir outros factores que conduzem ao aumento da frequência de organismos mutantes, para regiões do citocromo *b* de *P. jirovecii*, que não a região Q<sub>0</sub> [Esteves *et al.* 2010a; Esteves *et al.* 2010b].

A diversidade genética dos nucleótidos 110 e 215 do gene *SOD*, observadas no presente estudo, foram previamente detectadas por outros autores noutras regiões geográficas [Denis *et al.* 2000; Miller *et al.* 2005b]. No presente trabalho, pretendeu-se estudar potenciais relações entre estes SNPs e os diversos parâmetros da infecção por *P. jirovecii*. Foi observado que *SOD215C* está associado a casos de evolução clínica favorável. A alteração descrita na base 215 do gene *SOD* é um polimorfismo silencioso, não sendo esperada modificação na estrutura e na função da proteína. No entanto, sabe-se que polimorfismos sinónimos podem ser causa de interferência na actividade de proteínas, como resultado de associação com haplótipos que envolvem outros polimorfismos funcionais não sinónimos, ou, como consequência de diferenças alélicas específicas no enrolamento do mRNA (*folding*) que podem influenciar os processos de maturação e de eliminação de intrões e ligação de exões (*splicing*), de controlo transcripcional, ou, de regulação [Shen *et al.* 1999; Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007; Esteves *et al.* 2010a]. O facto de *SOD215C* ter sido significativamente mais frequente nos isolados dos doentes sem profilaxia anti-*P. jirovecii* instituída, e menos comum nos isolados dos doentes com regime profilático, sugere que este SNP poderá, de algum modo, estar associado a um determinado haplótipo, que seja mais sensível à acção do TMP-SMZ aplicado em regime profilático. Se por um lado, o fenómeno de epistasia, no qual a actividade de um gene pode ser alterada pela acção de outro gene, ou de diversos



genes, que se associam independentemente (segregação independente), não pode ser colocado de parte, por outro, foi já reconhecido que o fenómeno de resistência pode ser detectado e estudado por caracterização molecular de marcadores genéticos que podem não estar, aparentemente, relacionados de forma directa com *loci* de resistência de *P. jirovecii* a fármacos [Hauser *et al.* 2001b].

Do ponto de vista teórico, sabe-se que, se um agente antimicrobiano é utilizado com elevada frequência, durante um longo período de tempo, vão acabar por surgir casos de resistência a esse agente, mais concretamente, vai haver um aumento na frequência dos organismos resistentes, pois estes vão ser triados pela pressão selectiva, exercida pela ampla aplicação do fármaco. Visto que, para *P. jirovecii*, o fenómeno de resistência não pode ser monitorizado por meios clássicos, devido a este microrganismo não ser cultivável *in vitro*, as evidências para a resistência só podem ser obtidas de forma indirecta [Walker *et al.* 1998].

No presente estudo, verificou-se que *DHFR312C* está associado com cargas parasitárias baixas e com casos de diagnóstico clínico não compatível com PPc. Por outro lado, *DHFR312T* está correlacionado com cargas parasitárias moderadas a elevadas e com casos de diagnóstico clínico compatível com pneumocistose. O polimorfismo *DHFR312C* foi significativamente mais frequente entre os portadores assintomáticos do que *DHFR312T*. Aparentemente, o polimorfismo sinónimo da base 312 do gene *DHFR* poderá estar implicado com a maior, ou menor, severidade da infecção por *P. jirovecii*. Tal como para *SOD215C*, coloca-se a hipótese de que este polimorfismo silencioso poderá ser causa de interferência na actividade da proteína, como resultado de associação com haplótipos envolvendo outros polimorfismos funcionais não sinónimos, ou como consequência de diferenças alélicas específicas no *folding* do mRNA que podem influenciar os processos de maturação e *splicing*, de controlo transcripcional ou de regulação [Shen *et al.* 1999; Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007; Esteves *et al.* 2010a]. Apesar dos 31 SNPs conhecidos para o gene *DHFR*, apenas um estudo demonstrou a existência de correlação entre a ocorrência de polimorfismos não sinónimos e o insucesso profilático com inibidores da DHFR, nomeadamente com o TMP e a pirimetamina [Nahimana *et al.* 2004]. No presente estudo, nenhuma diferença significativa foi observada nas frequências de genótipos *DHFR* dos doentes com ou sem regimes profiláticos ou terapêuticos com TMP-SMZ.

Outros estudos demonstraram, consistentemente, associação entre o uso de fármacos da família das sulfas na profilaxia anti-*P. jirovecii* e os SNPs nas bases 165 e 171 do gene *DHPS* [Helweg-Larsen *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000; Armstrong *et al.* 2000]. No presente trabalho, estes SNPs foram detectados em baixas frequências, o que impossibilitou a existência de qualquer associação estatística entre os SNPs das bases 165 e 171 e os parâmetros clínicos em estudo, em especial a profilaxia e a terapêutica com TMP-SMZ, ou a evolução clínica dos doentes [Esteves *et al.* 2010a; Esteves *et al.* 2010b].

Com estes resultados, verificou-se que, de entre os polimorfismos estudados, os SNPs *mt85*, *SOD110*, *SOD215* e *DHFR312*, foram aqueles que demonstraram estar mais fortemente associados com parâmetros específicos da infecção por *P. jirovecii*, e, por isso, considerados como relevantes para o seguimento do estudo.

É de referir que alguns SNPs (*mt248T*, *SOD110C* e *DHFR312C*) foram associados a amostras provenientes de faixas etárias específicas. Sugere-se que a análise desta associação seja aprofundada em futuros estudos, com um maior número de amostras, de forma a estratificar os grupos etários e a averiguar a existência de associações entre as idades dos doentes com pneumocistose e esses polimorfismos.

A análise cruzada das sequências dos 10 *loci* estudados permitiu detectar algumas correlações estatisticamente significativas entre os SNPs identificados, sugerindo a existência de potenciais haplótipos: *mt85C/SOD215C*, *mt85A/DHFR312T*, *mt248C/SOD215T*, *CYB516C/DHFR312T*, *SOD110C/SOD215T* e *SOD110T/SOD215C*.

Os MLGs *mt85C/SOD215C* e *SOD110T/SOD215C* foram detectados apenas em casos de PPc com evolução clínica favorável. Aparentemente, estes genótipos estão associados com casos menos severos de pneumocistose. Por outro lado, o MLG *SOD110C/SOD215T* poderá estar correlacionado com casos mais severos de PPc, pois, os casos confirmados de PPc foram mais comuns entre os isolados de doentes com este genótipo. O MLG *mt85A/DHFR312T*, quando comparado com os outros MLGs, foi detectado numa frequência mais elevada entre os doentes do sexo feminino, demonstrando uma distribuição mais equitativa entre os dois géneros de doentes.

### 11.6.3. Genética da população

Quando se está perante uma população com distribuição panmítica, o teste d1 verifica especificamente, a distribuição de um determinado genótipo, sobre-representado nessa população, numa área geográfica conhecida. Este teste combinatório assume a existência de recombinação aleatória na população, explorando os critérios de clonalidade. Os resultados do teste providenciam indicações de diferentes manifestações de desequilíbrio de ligação, um factor muito importante na estrutura da população [Tibayrenc *et al.* 1990; Jimenez *et al.* 1997; Abderrazak *et al.* 1999]. A presença de um MLG em excesso, isto é, quando existem, numa determinada população, tantos ou mais indivíduos com um genótipo particular, do que aquilo que seria de esperar, é a evidência mais robusta e significativa de propagação clonal, indicando que esse MLG é replicado como uma unidade genética, sem troca, ou recombinação, de genes, fenómeno normalmente atribuído aos mecanismos de recombinação sexual. Quando, num estudo, a informação genética deriva de métodos de alta resolução e especificidade, como é o caso da PCR seguida de sequenciação de DNA ou de RFLP, a detecção repetida do mesmo MLG é uma forte indicação da ausência de recombinação genética por via sexual, que não necessita de testes estatísticos para ser confirmada. No entanto, a probabilidade da frequência observada, de um determinado MLG em excesso, assumindo combinação aleatória entre *loci*, pode ser testada por métodos combinatórios, como é o caso do teste d1 [Tibayrenc *et al.* 1991; Ngouanesavanh *et al.* 2006]. Os resultados obtidos no decorrer do presente trabalho sugerem elevada recombinação entre a maioria dos MLGs de *P. jirovecii*. Porém, mesmo com uma amostragem relativamente baixa, verificou-se, que um MLG específico (MLG E), ocorre em frequências significativamente mais elevadas do que seria esperado, de acordo com uma população panmítica, sugerindo que este MLG se encontra sobre-representado e, provavelmente, sob propagação clonal e em desequilíbrio de ligação. Alguns autores sugerem que a persistência de alguns genótipos numa população pode ser consequência de propagação clonal desses, poucos, mas altamente bem sucedidos genótipos. Todos estes dados indicam que, muito provavelmente, *P. jirovecii* é representado por uma população com estrutura epidémica, na qual o fenómeno de recombinação genética é frequente, mas ocasionalmente, um

clone bem sucedido, tende, rapidamente, a aumentar a sua frequência produzindo um clone epidémico [Tibayrenc *et al.* 1990; Smith *et al.* 1993].

O dendrograma NJ (*vide* 11.5.4, figura 17), baseado nas relações entre os MLGs de *P. jirovecii*, agrupou todos os isolados que continham a combinação de sequências *SOD110T/SOD215C* e *DHPS165A/DHPS171C* (grupo 2). Dos 33 isolados analisados no estudo populacional, 12 (36%) estão incluídos nesse grupo. Desses 12 isolados, cinco (42%) apresentaram MLG E. Novamente, os resultados apontam para uma propagação clonal de MLGs específicos de *P. jirovecii* [Smith *et al.* 1993; Abderrazak *et al.* 1999; Ngouanesavanh *et al.* 2006].

A provável estrutura epidémica da população de *P. jirovecii* coloca uma questão interessante, na perspectiva do ciclo de vida do parasita. Aparentemente, sob determinadas circunstâncias, a divisão celular assexuada, promove o rápido aumento de clones com características específicas, sugerindo que o fenómeno de fissão binária, que ocorre nos trofozoítos (células haplóides) do ciclo de vida de *P. jirovecii*, nos alvéolos pulmonares, poderá desempenhar um papel importante no surgimento de clones epidémicos [Yoshida 1989; Smith *et al.* 1993].

A relação observada entre os SNPs *SOD110* e *SOD215*, que se traduz pelo fenómeno de desequilíbrio de ligação, vem ao encontro da hipótese, que coloca a possibilidade de existirem diferentes haplótipos de *P. jirovecii*, que se caracterizam por diferentes capacidades de replicação e de propagação, podendo este fenómeno ter impacto, não só a nível da genética da população, mas também a nível das características da infecção estabelecida pelo microrganismo.

## **12. Desenvolvimento de metodologias de alto rendimento para análise de polimorfismos de *Pneumocystis jirovecii***

### **12.1. Importância da PCR *multiplex*/SBE associada à técnica de DNA *pooling* para genotipagem de *Pneumocystis jirovecii***

Recentemente, diversos métodos de genotipagem de SNPs foram desenvolvidos para o estudo do genoma humano, mas também para o estudo de outros organismos, incluindo alguns agentes infecciosos, como por exemplo, *P. falciparum* e *Mycobacterium tuberculosis* [Hirschhorn *et al.* 2000; Syvanen 2001; Gutacker *et al.* 2006; Kim & Misra 2007; Daniels *et al.* 2008]. As alterações de base única são a fonte mais comum de variações na sequência do DNA de *P. jirovecii*. Determinados SNPs podem produzir alterações moleculares que, de alguma forma, influenciam factores intrínsecos à patogenicidade e à transmissão de microrganismos, funcionando como marcadores moleculares adequados para estudos epidemiológicos e clínicos [Beard *et al.* 2000; Hauser *et al.* 2001b; Crothers *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008; Daniels *et al.* 2008]. As consequências de um SNP na actividade celular dependem directamente da localização genómica desse polimorfismo. SNPs localizados em regiões codificantes podem ter impacto a nível fenotípico, alterando a função do gene, onde se situam, ou a estrutura da proteína por ele codificada. Sabe-se também que, SNPs posicionados em regiões não codificantes, podem afectar a função do gene, ao alterarem o *splicing* e/ou a estabilidade do DNA, ou mesmo os níveis da proteína por ele codificada [Faber *et al.* 2005; Kim & Misra 2007]. Enquanto que, por um lado, alguns estudos apontam para que diversos indicadores de prognóstico clínico possam estar relacionados com a apresentação, a evolução e o desfecho da infecção por *P. jirovecii*, tendo sido associados com a evolução clínica da infecção [Barry & Johnson 2001; Morris *et al.* 2004; Thomas, Jr. & Limper 2007; Radhi *et al.* 2008; Walzer *et al.* 2008], por outro lado, os avanços no conhecimento da diversidade genética de *P. jirovecii* têm demonstrado que polimorfismos específicos podem determinar o perfil epidemiológico do microrganismo, como a sua distribuição geográfica, a resistência a fármacos, a virulência de alguns subtipos e os modos de transmissão [Keely & Stringer 1997; Olsson *et al.* 1998; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Miller & Wakefield 1999; Beard *et al.* 2000; Crothers *et al.* 2005; Miller *et al.* 2007].

Permanecem por esclarecer as razões pelas quais alguns doentes sofrem de graus moderados de PPc, com resposta favorável aos fármacos anti-*P. jirovecii*, enquanto outros sofrem de PPc severa, que pode ser fatal, apesar da terapia. O insucesso terapêutico pode ocorrer durante o tratamento ou a profilaxia. Estudos recentes sugerem que este insucesso poderá estar relacionado com determinados SNPs que ocorrem em *loci* específicos [Helweg-Larsen *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000; Armstrong *et al.* 2000; Hauser *et al.* 2001b; Matos *et al.* 2003b; Nahimana *et al.* 2004]. Com base no conhecimento actual sobre *P. jirovecii*, verifica-se que os resultados da aplicação dos esquemas terapêuticos e profiláticos anti-*P. jirovecii*, os dados sobre a intensidade da infecção, a sobrevivência e a evolução clínica dos doentes são pontos de interesse, a considerar no estudo de isolados de *P. jirovecii* associados a resistência a fármacos ou a maiores graus de severidade da infecção [Barry & Johnson 2001; Costa *et al.* 2005; Walzer *et al.* 2008].

Nesta fase do trabalho de investigação, pretendeu-se aplicar a técnica de PCR *multiplex* associada à técnica de genotipagem de SBE, para a identificação simultânea de SNPs específicos, seleccionados com base nos resultados da secção 11. A articulação destas duas técnicas (PCR *multiplex*/SBE) permite a identificação simultânea de diversos *loci* polimórficos, providenciando informação que pode ser utilizada para a caracterização de subtipos de *P. jirovecii*, bem como para a identificação de potenciais haplótipos que possam estar relacionados com os parâmetros da infecção. Estudos prévios demonstraram que a técnica de SBE reproduz uma metodologia de genotipagem robusta e exacta, permitindo a identificação paralela de múltiplos polimorfismos numa mesma reacção [Syvanen 1999; Vreeland *et al.* 2002; Gaspar *et al.* 2004; Faber *et al.* 2005; Kim & Misra 2007].

A metodologia de agrupamento de DNA, também designada por DNA *pooling*, é uma das mais promissoras técnicas para a identificação de polimorfismos relevantes que poderão ser utilizados como marcadores moleculares no estudo de doenças, e em especial, no estudo de populações de agentes patogénicos [Germer *et al.* 2000; Sham *et al.* 2002; Le Hellard *et al.* 2002; Haque *et al.* 2003]. No presente trabalho, esta técnica consistiu na quantificação, agrupamento proporcional e processamento das amostras, contendo DNA de *P. jirovecii*, obtido das secreções pulmonares de indivíduos infectados. Diferentes grupos (*pools*) de DNA foram constituídos a partir de grupos de

isolados, organizados com base nos respectivos parâmetros clínicos da infecção. A presença de diferenças nucleotídicas em posições específicas do DNA de uma subpopulação de *P. jirovecii* pode ser detectada por metodologias de sequenciação, como é o caso da PCR *multiplex*/SBE. Assim, as amostras, pertencentes aos grupos formados, foram sequenciadas para avaliação dos respectivos SNPs. Esta abordagem permitiu a identificação de polimorfismos presentes nos diferentes grupos em estudo, possibilitando a exclusão de SNPs considerados não relevantes, ou, conseguindo, por exemplo, classificá-los e relacioná-los com diferentes graus de gravidade da doença.

### 12.2. PCR *multiplex*

A técnica de PCR *multiplex* é uma variante da PCR, que tem por objectivo a amplificação de múltiplas sequências de DNA, numa única reacção. No final da década de 80, do século passado, foi demonstrado que a PCR poderia ser direccionada, simultaneamente, para vários *loci* de um organismo [Chamberlain *et al.* 1988]. Tratando-se de um método promissor e com elevada flexibilidade, a PCR *multiplex* tem vindo a ser desenvolvida, estabelecendo-se como uma técnica de uso generalizado, podendo ser usada em combinação com outras técnicas moleculares, quer de hibridação, quer enzimáticas, como por exemplo: sondas OLA, do inglês *oligonucleotide ligation assay*, sondas ASO, do inglês *allele specific oligonucleotide*, sondas *Taqman*, SBE, mini-sequenciação, piro-sequenciação, SSCP, ou RFLP. A aplicação desta técnica compreende, actualmente, a identificação e caracterização genética de agentes patogénicos, o diagnóstico de doenças genéticas, os estudos forenses, a quantificação de DNA, a análise de *linkage disequilibrium*, entre outros estudos genéticos. Para além de permitir a distinção entre microrganismos de diferentes espécies, numa mesma reacção, a PCR *multiplex* apresenta-se como uma excelente ferramenta para o estudo e identificação de subtipos de microrganismos não cultiváveis, como é o caso de *P. jirovecii*. O desenho de *primers* específicos, dirigidos a regiões divergentes, possibilita a distinção entre subgrupos do microrganismo, permitindo uma avaliação rápida da amostra em estudo. A técnica de *multiplex* permite obter resultados de diversas PCRs, de uma forma mais célere, agilizando os processos, tornando-os menos morosos e evitando o recurso a maiores quantidades de reagentes. Para além das vastas aplicações, esta técnica permite a diminuição do tempo e dos custos de operação,

aumentando, por isso, o rendimento das técnicas associadas [Edwards & Gibbs 1994; Syvanen 2001; Markoulatos *et al.* 2002; Faber *et al.* 2005]. Porém, este procedimento apresenta alguns obstáculos, que requerem uma fase de optimização bastante atenta e minuciosa. A sensibilidade e a especificidade da PCR *multiplex* são ligeiramente menores quando comparadas com a PCR convencional, cujo rendimento depende apenas da amplificação de um fragmento, existe um limite para o número de fragmentos a amplificar, pois torna-se impossível a amplificação de um número ilimitado de sequências, pode ocorrer amplificação preferencial de alguns amplicões, e pode verificar-se um aumento da probabilidade de formação de produtos inespecíficos (ex. dímeros de *primers*), devido à presença de múltiplos pares de *primers* [Pastinen *et al.* 2000; Hirschhorn *et al.* 2000; Syvanen 2001; Markoulatos *et al.* 2002]. Assim, para desenvolver uma PCR *multiplex* eficiente [Edwards & Gibbs 1994; Shuber *et al.* 1995], o processo de optimização tem de considerar diversos parâmetros críticos, tais como:

- 1) Dimensão e características dos fragmentos a amplificar;
- 2) Estruturação e desenho dos *primers*;
- 3) Características e quantidade da polimerase;
- 4) Concentração de magnésio (co-factor da polimerase);
- 5) Concentração do tampão de reacção (específico para a polimerase);
- 6) Quantidade de dNTPs;
- 7) Condições térmicas dos ciclos de amplificação (desnaturação, hibridação e extensão);
- 8) Uso de adjuvantes (DMSO, BSA, ou glicerol).

**1) Dimensão e características dos fragmentos amplificados:** O tamanho dos amplicões gerados através da PCR *multiplex* deve ser variável (entre 100 e 500 pb) de modo a ser possível distinguir os múltiplos produtos de reacção, pelas respectivas migrações, quando submetidos a corridas electroforéticas em géis de agarose ou de acrilamida. Contudo, na literatura, não estão determinados os aspectos práticos que justifiquem uma limitação rigorosa, sendo, por isso, normal incluir amplicões fora das dimensões acima mencionadas [Sanchez *et al.* 2003]. As regiões de DNA seleccionadas para amplificação múltipla devem ser determinadas pela natureza da análise, isto é, quando se pretendem estudar deleções genéticas, devem-se amplificar exões, quando



se desenham protocolos forenses para a distinção de indivíduos, devem seleccionar-se marcadores altamente polimórficos, e quando se estudam microrganismos, devem-se escolher locais mais conservados para a diferenciação entre espécies, ou regiões com maiores graus de variabilidade genética para analisar subgrupos de uma mesma espécie [Edwards & Gibbs 1994].

**2) Estruturação e desenho dos *primers*:** A informação detalhada das sequências a amplificar é essencial para a selecção dos *primers*. Só com esta informação se pode evitar amplificações inespecíficas, que podem ocorrer noutras regiões que possuam sequências semelhantes, ou a redução da taxa de amplificação, que pode ocorrer devido ao mau emparelhamento, entre os *primers* e a cadeia molde, nos locais de ligação [Edwards & Gibbs 1994]. A dimensão dos *primers* pode ser variável (entre 18 e 28 bases), sendo que oligonucleótidos mais longos (28 a 34 bases) possibilitam a utilização de temperaturas de hibridação mais elevadas, aumentando a especificidade da reacção e diminuindo o aparecimento de produtos inespecíficos. Para que se obtenha um bom rendimento da PCR *multiplex*, os oligonucleótidos devem ser desenhados para temperaturas de hibridação entre os 55 e os 65°C. Os *primers*, envolvidos na mesma reacção, devem apresentar temperaturas de hibridação muito próximas, não devendo variar mais de 2°C entre si, contribuindo este factor para a obtenção de produtos de amplificação com eficiência semelhante. A quantidade de CG deve situar-se, se possível, entre os 40 e os 60%, sendo este um factor importante para a estabilidade da ligação entre o *primer* e a cadeia molde. [Edwards & Gibbs 1994; Shuber *et al.* 1995; Henegariu *et al.* 1997; Markoulatos *et al.* 2002; Sanchez *et al.* 2003]. A complementaridade entre zonas internas de *primers* deve ser evitada, de modo a não permitir a formação de estruturas secundárias. Estas estruturas implicam uma ligação deficiente com a região homóloga da cadeia molde, provocando limitações à passagem da polimerase. Outro factor que deve ser evitado é a interacção entre *primers*, que conduz à formação de dímeros de *primers*, diminuindo o rendimento da reacção. Diversos programas bioinformáticos, como o BLAST (versão 2.2) disponível no sítio do *National Centre for Biotechnology Information's* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), podem ser utilizados para estimar a complementaridade dos *primers* com outras regiões genómicas, para prevenir a formação de estrutura secundárias, e para que as sequências

dos oligonucleótidos tenham homologia diminuta entre si, especialmente complementaridade na extremidade 3' (local de ligação à cadeia molde) [Henegariu *et al.* 1997; Sanchez *et al.* 2003]. A concentração de *primers* é um aspecto importante para que se obtenha uma quantidade idêntica de produtos de PCR dos diferentes amplicões, podendo variar entre os 0,01 e os 0,42  $\mu\text{M}$ . Os *primers* devem de encontrar-se em solução, num excesso molar de aproximadamente  $10^7$ , relativamente à cadeia molde, não devendo, na generalidade, atingir concentrações superiores a 0,5  $\mu\text{M}$ . Um valor demasiado elevado do rácio entre as concentrações de *primers* e a cadeia molde, facilita a formação de dímeros de *primers*, enquanto que um valor demasiado baixo desse rácio, provoca uma reacção de amplificação não exponencial, pois a quantidade limitante de *primers* implica um número mais reduzido de ligações à cadeia molde durante os ciclos de amplificação, reduzindo drasticamente o rendimento [Markoulatos *et al.* 2002].

**3) Características e quantidade da polimerase:** A enzima de polimerização de DNA é um factor nuclear de toda a PCR *multiplex*. A polimerase deve ser escolhida de acordo com alguns factores que determinam a qualidade do processo, tais como a actividade e a fidelidade da enzima. Sabe-se que pode ocorrer hibridação de *primers* a baixas temperaturas (entre os 4 e os 25°C), antes do início das reacções de *multiplex*, o que faz com que enzimas que requerem activação inicial permitam a eliminação de reacções não específicas, como a formação dos dímeros de *primers* [Markoulatos *et al.* 2002].

**4) Concentração de magnésio:** O magnésio é adicionado à mistura de reacção sob a forma de  $\text{MgCl}_2$ , sendo a sua concentração determinante para o bom desempenho da polimerase que é dependente do ião magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (cofactor) [Henegariu *et al.* 1997]. O  $\text{Mg}^{2+}$  também se liga às estruturas nucleotídicas (tendencialmente carregadas negativamente), como os *primers*, os dNTPs e as cadeias de DNA molde, fazendo com que a sua concentração óptima dependa das quantidades destes elementos na mistura reaccional. As concentrações de  $\text{Mg}^{2+}$  não devem de exceder os 8 mM, pois, quando em excesso, este ião vai, por um lado, estabilizar as cadeias duplas de DNA, impedindo a sua completa desnaturação, e por outro, viabilizar a hibridação aleatória de *primers* a locais não específicos da cadeia molde, diminuindo a especificidade da reacção e

aumentando a formação de produtos inespecíficos [Henegariu *et al.* 1997; Markoulatos *et al.* 2002].

**5) Concentração do tampão de reacção:** A PCR *multiplex*, quando comparada com uma PCR convencional, parece funcionar melhor com concentrações salinas mais elevadas, fazendo com que o aumento da concentração do tampão de reacção corresponda a um incremento na eficiência da reacção. Esta abordagem parece ser mais eficaz do que a junção de adjuvantes, indicando que a maior quantidade de produtos de reacção obtidos durante uma PCR *multiplex*, necessita de uma maior quantidade de agentes estabilizadores. Por outro lado, os fragmentos de menor peso molecular parecem amplificar melhor a elevadas concentrações salinas, enquanto que baixas concentrações salinas parecem favorecer a amplificação de produtos de reacção mais longos, devendo-se encontrar um ponto de equilíbrio durante o processo de optimização [Markoulatos *et al.* 2002].

**6) Quantidade de dNTPs:** A concentração de dNTPs é um factor limitante das reacções de amplificação de DNA. Na técnica de PCR *multiplex*, o equilíbrio entre as concentrações de  $MgCl_2$  e de dNTPs é um factor crucial, com impacto na eficiência da reacção. Estima-se que, para uma concentração de  $MgCl_2$  de 2 mM, a concentração de cada dNTP deva ser de 200 a 600  $\mu M$ . O aumento excessivo de dNTPs pode inibir a amplificação das regiões de interesse, pois os dNTPs em solução vão capturar grandes quantidades de  $Mg^{2+}$ , indisponibilizando-o para a polimerase. Baixas concentrações de dNTPs originam quantidades pouco visíveis de produtos de reacção, pois a reacção ocorre em menor escala, ao ser limitada pela baixa disponibilidade de bases nucleotídicas. Para a optimização de uma PCR *multiplex* eficiente, o equilíbrio entre as concentrações de  $MgCl_2$  e de dNTPs deve ser encontrado [Markoulatos *et al.* 2002].

**7) Condições térmicas dos ciclos de amplificação:** As condições de temperatura aplicadas numa PCR *multiplex* são parâmetros fundamentais na optimização do método, pois, a presença de diversas cadeias molde de múltiplos *loci* e de diferentes pares de *primers*, acata problemas adicionais. No decorrer da reacção, o aumento do número de cópias dos amplicões é acompanhado pela formação de produtos

inespecíficos que levam à redução da concentração efectiva de cadeias molde. A temperatura de hibridação está directamente dependente da selecção dos *primers*, e deve ser determinada previamente, através da amplificação simples de cada fragmento, não devendo variar mais de 2°C entre os diferentes PCRs individuais. Por vezes, a amplificação simultânea dos fragmentos implica a diminuição da temperatura de hibridação, entre 4 e 6°C. Enquanto o tempo de hibridação parece não ter grande interferência no sucesso da amplificação, o tempo de extensão deve considerar a dimensão dos amplicões. No final da optimização da técnica, as temperaturas dos ciclos têm de garantir a desnaturação das diversas cadeias molde, a hibridação específica dos múltiplos pares de *primers* e a correcta extensão dos produtos de amplificação pretendidos [Edwards & Gibbs 1994; Henegariu *et al.* 1997].

**8) Uso de adjuvantes:** Alguns protocolos de PCR *multiplex* podem ser melhorados com a adição de compostos específicos. Moléculas como o DMSO, o glicerol ou a BSA, facilitam a desnaturação das cadeias molde de DNA, permitindo o acesso dos *primers* às regiões complementares de uma forma mais eficaz. Outro coadjuvante utilizado para aumentar o sucesso da PCR *multiplex* é a BSA, que actua como estabilizador da polimerase, aumentando a reprodutibilidade e a eficiência da reacção [Markoulatos *et al.* 2002].

### 12.3. Técnica de *single base extension* (SBE)

Ao longo das últimas três décadas, genes polimórficos de *P. jirovecii* têm vindo a ser estudados com o intuito de clarificar o perfil epidemiológico deste parasita, com especial atenção para a prevalência geográfica, severidade da infecção, resistência a fármacos e transmissão de determinados subtipos, ou genótipos. A descoberta de múltiplos SNPs abriu as portas para diversos estudos de associação genética, onde se tenta determinar a existência de haplótipos característicos. Porém, os resultados parecem inconsistentes e, por vezes, discrepantes entre os diferentes estudos, sendo que, até à data, poucos foram os resultados onde se conseguiram associar SNPs específicos a factores da infecção por *P. jirovecii* [Olsson *et al.* 1998; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Miller & Wakefield 1999; Armstrong *et al.* 2000; Helweg-Larsen *et al.* 2001; Hauser *et al.* 2001a; Hauser *et al.* 2001b; Huang *et al.* 2006; Costa *et al.* 2006b; Miller *et al.* 2007;

Matos & Esteves 2010b]. As limitações técnicas deste tipo de abordagem, poderão estar na origem deste insucesso relativo, visto que, até há bem pouco tempo, as tecnologias disponíveis para genotipagem, eram de um modo geral morosas, dispendiosas e limitadas às quantidades de amostras e de *loci* a analisar. Recentemente, a evolução registada nas metodologias de caracterização genética, veio permitir um aumento do rendimento e uma diminuição dos custos implícitos, permitindo análises de associação genética mais amplas e sensíveis [Pastinen *et al.* 2000; Fan *et al.* 2000; Hirschhorn *et al.* 2000; Syvanen 2001; Sauer *et al.* 2002; Lindroos *et al.* 2002; Lindroos *et al.* 2003].

Os métodos de genotipagem actuais recorrem, numa primeira fase, à amplificação das regiões genómicas de interesse, onde se localizam os SNPs. Nessa primeira abordagem, a PCR, ou uma das técnicas derivadas, são os métodos de eleição para a obtenção de um elevado número de cópias das regiões em estudo, o que promove a especificidade e a sensibilidade necessárias para a discriminação de genótipos. Após este passo, onde são geradas grandes quantidades de cópias dos alelos de interesse, segue-se a detecção e a identificação dos SNPs, localizados nos *loci* em análise. A discriminação alélica é, normalmente, feita com base em reacções de alta especificidade [Hirschhorn *et al.* 2000; Faber *et al.* 2005; Kim & Misra 2007], existindo cinco métodos bastante utilizados:

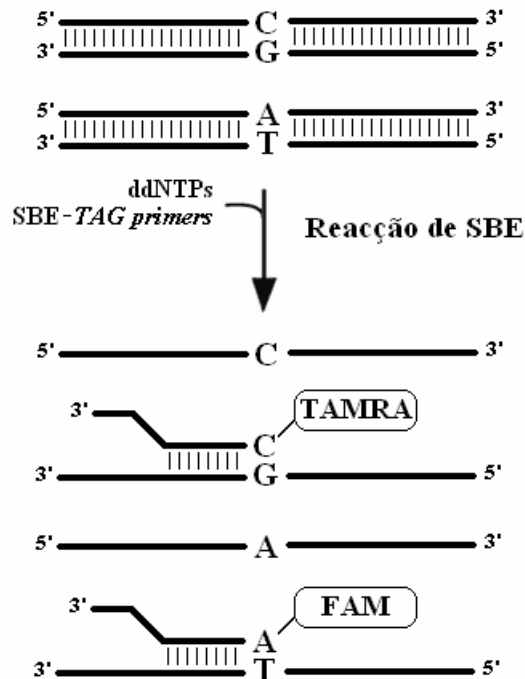
- 1) Sequenciação directa dos produtos de amplificação;
- 2) Extensão de *primers* por incorporação de nucleótidos;
- 3) Hibridação com sondas oligonucleótidas marcadas;
- 4) Ligação com sondas oligonucleótidas de complementaridade;
- 5) Clivagem enzimática por corte específico de sequências de DNA.

Durante a última década, a técnica de SBE tem vindo a ser amplamente desenvolvida no âmbito da genotipagem de SNPs, assentando num método relativamente rápido, automatizável, robusto e compatível com processos de monitorização de alta tecnologia [Syvanen 1999; Lindroos *et al.* 2002; Vreeland *et al.* 2002; Lindroos *et al.* 2003]. A reacção de SBE fundamenta-se nos princípios gerais da técnica de PCR, verificando-se, no entanto, algumas diferenças. A reacção de SBE assenta num ciclo de reacções onde a amplificação decorre de forma linear, ao contrário da reacção de PCR, onde o tipo de amplificação é exponencial. Outra diferença reside

no uso de dideoxinucleótidos (ddNTPs), ao invés de dNTPs. A polimerização de uma reacção de SBE requer enzimas termoestáveis e com elevada eficiência para a incorporação de ddNTPs terminadores, que se caracterizam pela ausência do grupo OH a 3'. Apenas um ddNTP, marcado com fluorescência específica, é incorporado à região 5' do *primer*, que se caracteriza por ser complementar à cadeia molde na região imediatamente antes da base onde se localiza o polimorfismo (figura 18). Esta técnica pode ser aplicada na genotipagem de SNPs e na determinação de deleções ou de inserções genéticas. A natureza do SNP é revelada pela identidade do nucleótido incorporado, mais especificamente, pelo sinal de fluorescência emitido pelo ddNTP, sendo que, cada um dos ddNTPs, presentes na mistura de reacção, se encontra marcado com um fluoróforo diferente. Uma deleção ou inserção genética é analisada pela presença ou ausência de sinal, isto é, os *primers* são desenhados para serem complementares à região da cadeia molde, supostamente delectada, ou inserida, observando-se fluorescência apenas quando há ligação do *primer* e consequente incorporação de um ddNTP [Fan *et al.* 2000; Gaspar *et al.* 2004; Faber *et al.* 2005].

A reacção de SBE revela-se bastante útil, especialmente, quando se pretendem analisar mais do que um SNP de uma só vez. Assim, esta metodologia de discriminação de diferentes SNPs pode envolver a hibridação de produtos de PCR *multiplex* com oligonucleótidos complementares ao gene alvo. Os *primers*, complementares às sequências das cadeias molde em estudo, e que terminam na posição nucleotídica imediatamente antes dos polimorfismos a 5', são desenvolvidos consoante o número de SNPs a analisar. Para a discriminação dos produtos de reacção, recorre-se a técnicas específicas de alta resolução, como géis de separação, os quais permitem a distinção dos produtos de reacção com base no seu tamanho. Devido aos *primers* utilizados nesta técnica possuírem dimensões bastante semelhantes entre si, deve-se recorrer ao uso de sondas específicas, denominadas por sequências *TAG*. Uma sonda específica *TAG* encontra-se acoplada a cada *primer* de SBE (*SBE-TAG primers*) com o intuito de garantir a identificação dos fragmentos obtidos, também através das suas dimensões. As sequências *TAG* devem ser seleccionadas de forma a garantir a inexistência de homologia com o DNA do organismo em estudo, de forma a evitar interferências de reacções cruzadas durante a reacção de SBE. A aplicação conjunta da PCR *multiplex* com a SBE (PCR *multiplex*/SBE) permite redução de tempo, de consumo de reagentes

e, consequentemente, dos custos de um estudo genético alargado, pois possibilita a genotipagem simultânea de múltiplos polimorfismos em apenas dois passos [Vreeland *et al.* 2002; Faber *et al.* 2005].



**Figura 18.** Esquema representativo da técnica de SBE utilizada para a genotipagem de SNPs de *P. jirovecii*. Após amplificação dos *loci* em estudo por PCR *multiplex*, promove-se a reacção de SBE, recorrendo-se a SBE-TAG *primers* e a ddNTPs marcados com fluorocromos. Os SNPs são identificados, tendo por base o tamanho e a fluorescência emitida pelos fragmentos obtidos (ex. TAMRA – amarelo e FAM – azul).

#### 12.4. Pools de DNA

A metodologia de agrupamento de DNA permite a identificação de variações genéticas específicas num elevado número de indivíduos, provenientes de uma determinada população, possibilitando a avaliação de polimorfismos relevantes, que poderão ser utilizados como marcadores moleculares no estudo dessa população. O DNA *pooling* tem vindo a ser desenvolvido com o objectivo de utilizar metodologias de alto rendimento para o estudo genético de diversos organismos. Trata-se de uma técnica inovadora de biologia molecular que permite a redução de custos dos estudos em larga escala, nos quais se pretende identificar potenciais *loci* relacionados com

factores de doenças. O *DNA pooling* permite que as frequências alélicas de grupos de indivíduos sejam determinadas, tornando possível aplicar um número muito menor de reacções de PCR e de métodos de genotipagem associados, quando comparado com as tradicionais metodologias de genotipagem a amostras individuais [Sham *et al.* 2002; Le Hellard *et al.* 2002].

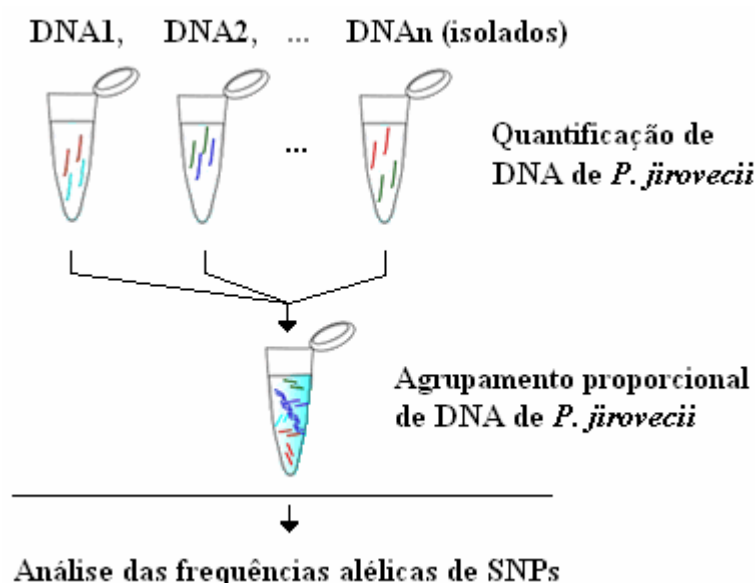
Como tem vindo a ser evidenciado, por inúmeros estudos realizados, a avaliação do potencial efeito de um polimorfismo na capacidade infecciosa de microrganismos patogénicos, como *P. jirovecii*, é um processo bastante moroso. Os estudos de caracterização genética, realizados em *P. jirovecii*, demonstraram a existência de numerosos SNPs, em dezenas de *loci* polimórficos [Stringer 1996; Lee *et al.* 1998; Ma & Kovacs 2001; Hauser *et al.* 2001a; Stringer 2002; Stringer *et al.* 2002; Takahashi *et al.* 2002b; Beard *et al.* 2004; Costa *et al.* 2006b; Kutty *et al.* 2008; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Esteves *et al.* 2010b; Matos & Esteves 2010b]. No entanto, apenas é esperada associação entre alguns dos parâmetros da infecção por *P. jirovecii* e uma quantidade minoritária de marcadores polimórficos, fazendo com que, após caracterização e determinação dos SNPs mais relevantes, a análise dessas variações em amostras de *pools* de DNA facilite a avaliação do verdadeiro impacto desses SNPs, permitindo confirmá-los como variações associadas a parâmetros da infecção, ou excluí-los como alterações genómicas pontuais não relevantes. Para avaliar o potencial efeito de um polimorfismo específico, na modulação da acção de *P. jirovecii* na pneumocistose, em estudos que envolvam amostras de *pools* de DNA, será sempre necessário comparar as frequências alélicas em *pools* com diferentes características, isto é, devem-se sempre analisar subpopulações de *P. jirovecii* isolados de doentes classificados em diferentes categorias, como por exemplo, doentes com casos confirmados de PPc, doentes com casos de PPc com apresentação clínica atípica, ou, doentes com casos subclínicos de PPc (portadores assintomáticos de *P. jirovecii*), de modo a determinar o impacto do polimorfismo nesses grupos, ou subgrupos de doentes. Os resultados permitem a identificação dos polimorfismos presentes nos diferentes grupos em estudo, bem como, o cálculo das suas frequências, conseguindo, por exemplo, relacioná-los com os graus de maior gravidade da doença (ex. SNPs detectados em grande frequência nos doentes com elevadas cargas parasitárias, ou com evolução clínica desfavorável).



Para obtenção de resultados fidedignos, que espelhem com exactidão as frequências dos SNPs presentes nos grupos de isolados de *P. jirovecii*, com diferentes características, são necessárias técnicas de quantificação de DNA exactas e precisas. Só desta forma as metodologias de alto rendimento se revelam úteis e eficazes. A inexactidão e a imprecisão na quantificação de DNA podem aumentar a variabilidade entre as porções de DNA que constituem os *pools*, resultando na preparação de *pools* que conduzem a cálculos de frequências alélicas inadequadas e desvios nas estimativas de associação entre os SNPs e os dados clínicos. Para que a comparação de frequências alélicas seja reproductível, esta metodologia requer técnicas específicas, como a quantificação fluorométrica de DNA por incorporação de marcadores fluorescentes de alta afinidade, ou, a determinação de concentrações alélicas por RT-PCR. De um modo geral, todas estas técnicas permitem estimar, com exactidão, o número de cópias dos *loci* em análise, ou seja, a abundância relativa dos alelos presentes num *pool*, devendo-se sempre ter em conta as propriedades genéticas do organismo em estudo e as características das regiões seleccionadas (ex. genes de cópia única ou multicópia, genes nucleares ou mitocondriais). Só desta forma se consegue agrupar as quantidades exactas e proporcionais de cada amostra individual numa amostra de *pool* de DNA (figura 19) [Germer *et al.* 2000; Le Hellard *et al.* 2002; Inbar *et al.* 2002; Haque *et al.* 2003].

O número de indivíduos representado em cada amostra de *pool* de DNA deve ser elevado, de modo a permitir poder estatístico suficiente para uma análise conclusiva. Esta metodologia representa um poderoso instrumento molecular, uma vez que os *pools* de DNA são independentes do tamanho da população, ou seja, são independentes do número de amostras individuais que integram os *pools*. Em estudos de genética humana, onde, de um modo geral, a obtenção de um grande número de amostras e de quantidades de DNA é relativamente fácil, estima-se que as frequências alélicas possam ser obtidas em *pools* de 100 a 1000 amostras individuais [Shaw *et al.* 1998; Le Hellard *et al.* 2002]. A dificuldade inerente à obtenção de amostras pulmonares de doentes com *P. jirovecii* (ex. EI ou LBA) e a inexistência de um processo sustentado de cultivo do microrganismo são factores que, em parte, dificultam a formação de *pools* que abranjam um elevado número de amostras individuais [Sloand *et al.* 1993; Stringer 1996; Beck & Cushion 2009]. Assim, a aplicação de DNA *pooling* ao estudo genético de *P. jirovecii* deve seguir o aspecto crucial de potenciar a exactidão da estimativa de frequências

alélicas, tendo em vista a avaliação de diferenças estatisticamente significativas nos subgrupos em análise. Deste modo, com a realização de uma única reacção de PCR *multiplex*/SBE numa amostra de *pool* de DNA, é possível identificar os polimorfismos cujas frequências alélicas aparentam ser preponderantes nos diversos subgrupos em estudo, acarretando uma diminuição dos custos e do tempo de operação necessários. No final, a associação dos SNPs com os parâmetros da infecção é constatada se a diferença nas frequências alélicas entre os subgrupos for significativa [Germer *et al.* 2000; Sham *et al.* 2002; Le Hellard *et al.* 2002; Inbar *et al.* 2002].



**Figura 19.** Esquema representativo da técnica de *DNA pooling* utilizada para a identificação de polimorfismos potencialmente associados com parâmetros clínicos da infecção por *P. jirovecii*. Esta estratégia permite a obtenção de iguais concentrações de DNA proveniente de cada amostra individual, numa amostra final, representativa de um grupo da população do microrganismo em estudo, com determinadas características.

A identificação de múltiplos SNPs associados a *pools* compostos por isolados com determinados parâmetros da infecção por *P. jirovecii* permite, eventualmente, a definição de haplótipos, que de alguma forma, poderão estar implicados na apresentação e evolução clínica dos casos de PPC. As diferentes associações de SNPs, ou haplótipos, poderão conferir ao microrganismo características distintas, influenciando a gravidade da infecção. Assim, os haplótipos de *P. jirovecii* com diferentes características poderão

ser identificados por SNPs de múltiplas regiões genéticas, que poderão funcionar como marcadores moleculares. Ao serem definidos, os haplótipos poderão dar um importante contributo na avaliação dos casos clínicos de PPc, através da caracterização genética dos respectivos isolados [Hauser *et al.* 2001b; Le Hellard *et al.* 2002; Esteves *et al.* 2010a; Matos & Esteves 2010b].

## 12.5. Material e métodos

Após identificação dos polimorfismos de *P. jirovecii* que demonstraram estar, de alguma forma, relacionados com parâmetros da infecção, e, por isso, considerados como relevantes para o estudo (*mt85*, *SOD110*, *SOD215* e *DHFR312*), procedeu-se à optimização e aplicação das técnicas de PCR *multiplex*/SBE em *pools* de DNA. Com esta metodologia, e com a respectiva integração dos resultados, pretendeu-se demonstrar a vantagem de aplicar novas metodologias, sensíveis, robustas e com capacidade de processar grandes quantidades de amostras, de forma a estabelecer potenciais haplótipos relacionados com parâmetros da infecção por *P. jirovecii*.

### 12.5.1. Selecção das amostras

Os isolados de *P. jirovecii* utilizados nesta fase da investigação dividiram-se em dois grupos. O primeiro grupo corresponde aos isolados utilizados na fase exploratória de optimização das técnicas de PCR *multiplex* e de SBE, e o segundo grupo, corresponde aos isolados utilizados na fase de desenvolvimento e análise dos *pools* de DNA de *P. jirovecii*.

Optimização da PCR *multiplex* e da SBE. No total, 50 isolados, previamente analisados e considerados positivos para *P. jirovecii* por PCR *nested*, obtidos entre 2000 e 2006, foram submetidos à técnica de PCR *multiplex*, apresentando todos, como resultado de amplificação, os três fragmentos correspondentes aos *loci* em estudo (*mtLSU rRNA*, *SOD* e *DHFR*). Das amostras testadas nesta fase de optimização:

1) 25 (50%) pertenciam ao grupo dos doentes seropositivos para VIH com PPc confirmada laboratorialmente e com quadro clínico compatível (identificação parasitológica e detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc);

2) 10 (20%) foram obtidas de doentes seropositivos para VIH com apresentação clínica atípica de PPc (identificação parasitológica e detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, não preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc);

3) 10 (20%) foram obtidas de doentes seropositivos para VIH com infecção subclínica, considerados portadores assintomáticos de *P. jirovecii* (identificação

parasitológica negativa para *P. jirovecii*, detecção molecular positiva para *P. jirovecii*, não preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc);

4) Cinco (10%) foram obtidas de doentes seronegativos para VIH, com outras causas de imunossupressão, com PPc (identificação parasitológica e/ou detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc). Este último grupo de doentes foi considerado, nesta fase do estudo, com o intuito de investigar a existência de diferenças significativas na distribuição de genótipos de *P. jirovecii* entre doentes com co-infecção VIH/*P. jirovecii* e doentes seronegativos para VIH com pneumocistose.

Dos 50 isolados de *P. jirovecii* estudados por PCR *multiplex*, 32 (64%) foram testados para a técnica de SBE. Os isolados seleccionados, correspondem a amostras previamente genotipadas para os quatro SNPs em estudo (*mt85*, *SOD110*, *SOD215* e *DHFR312*), o que permitiu a comparação entre os resultados da análise SBE e os resultados da técnica de sequenciação directa.

Desenvolvimento e análise de *pools* de DNA de *P. jirovecii*. Com o objectivo de otimizar a técnica de quantificação de DNA por RT-PCR, para posterior preparação e agrupamento dos *pools*, foram testados três isolados, caracterizados por serem positivos pelos diversos métodos de detecção parasitológica e molecular de *P. jirovecii* (IFI/AcM, PCR *nested*, PCR simples para os genes em análise e PCR *multiplex*), e que, por apresentarem estas características, funcionaram como controlos positivos, durante o processo de optimização da técnica. Adicionalmente, quinze isolados (detecção parasitológica e molecular positivas para *P. jirovecii*), seleccionados de forma aleatória, foram utilizados na preparação de uma amostra padrão, através de uma PCR ao gene *KEX1* de *P. jirovecii*. Os produtos de PCR foram quantificados por um método fluorométrico de quantificação de DNA, tendo sido elaborada uma curva padrão que correlaciona a concentração do gene *KEX1* e os resultados de quantificação por RT-PCR. A quantificação de DNA de *P. jirovecii* nos diversos isolados foi efectuada através da técnica de RT-PCR, consistindo na comparação dos resultados da quantificação absoluta do gene nuclear de cópia única *KEX1* de *P. jirovecii*, com a amostra padrão, através da curva de calibração.

Após validação da técnica de quantificação de DNA, a preparação dos *pools* foi executada com porções específicas de amostras individuais, tendo sido possível a utilização de um total de 100 isolados de *P. jirovecii*, obtidos entre 2001 e 2008, distribuídos pelos seguintes grupos:

**A1)** 20 (20%) isolados de doentes seropositivos para VIH com PPc confirmada laboratorialmente, com quadro clínico compatível (identificação parasitológica e detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc), nos quais foram detectadas cargas parasitárias baixas;

**A2)** 20 (20%) isolados de doentes seropositivos para VIH com PPc confirmada laboratorialmente, com quadro clínico compatível e com cargas parasitárias moderadas;

**A3)** 25 (25%) isolados de doentes seropositivos para VIH com PPc confirmada laboratorialmente, com quadro clínico compatível e com cargas parasitárias elevadas;

**B/C)** 20 (20%) isolados de doentes seropositivos para VIH, sem quadro clínico compatível com PPc, mas com detecção laboratorial de *P. jirovecii* (identificação parasitológica ou detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, não preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc), englobando os doentes com apresentação clínica atípica de PPc (grupo B) e os portadores assintomáticos (grupo C);

**D)** 15 (15%) isolados de doentes seronegativos para VIH, com outras causas de imunossupressão (quatro recém-nascidos, quatro crianças entre os três meses e os 10 anos de idade, sem causa definida de imunodeficiência, 4 doentes neoplásicos e três transplantados), com PPc confirmada laboratorialmente e com quadro clínico compatível com PPc (identificação parasitológica ou detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc).

Foi ainda possível, efectuar uma substratificação da amostra inicial, a partir de 45 isolados do grupo A, isto é, de doentes seropositivos para VIH, com casos de PPc confirmados laboratorialmente (identificação parasitológica e detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, preenchendo os critérios do diagnóstico clínico de PPc), formando-se os seguintes subgrupos:

**E)** 25 (56%) isolados de doentes seropositivos para VIH, com casos de PPc que apresentaram evolução clínica favorável;

F) 20 (44%) isolados de doentes seropositivos para VIH, com casos de PPc que apresentaram evolução clínica desfavorável.

### 12.5.2. Amplificação de múltiplos marcadores polimórficos por PCR *multiplex*

Para aplicação da técnica de PCR *multiplex*, foram utilizados os pares de *primers* correspondentes aos três *loci*, nos quais foram identificados SNPs considerados relevantes. Assim, foram seleccionados os seguintes pares de *primers*: pAZ102-X e pAZ102-E para amplificação do gene *mtLSU rRNA*, MnSODFw e MnSODRw para amplificação do gene *SOD*, FR208 e FR1018 para amplificação do gene *DHFR* (vide 11.4.7, quadro XV). Visto que as PCRs simples, usadas para amplificar os três *loci* de forma individual, funcionaram a uma temperatura de hibridação de 61,5°C, manteve-se esta temperatura de hibridação para a PCR *multiplex*. As reacções de PCR *multiplex* foram optimizadas para um volume de 50 µl contendo, por cada amostra, 1,5x tampão de reacção (75 mM KCl, 15 mM Tris-HCL [pH 8,3]; Applied Biosystems), 0,5 mM de cada dNTP (Applied Biosystems), 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 2,5 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 0,01 µg/µl de BSA (SIGMA), 0,75 µl de DMSO (SIGMA), 4 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. As quantidades, dos diferentes *primers* usados, variaram em função do amplicão pretendido, tendo sido optimizada uma concentração de 0,6 µM para pAZ102-X e pAZ102-E, de 1 µM para MnSODFw e MnSODRw, e de 1,2 µM para FR208 e FR1018 (MWG Biotech). Em cada ensaio, a qualidade das reacções foi avaliada recorrendo-se a um controlo positivo (suspensão de DNA de *P. jirovecii*) e a um controlo negativo (água destilada estéril), substituindo, nas respectivas reacções, os 4 µl de DNA genómico das amostras. As condições térmicas (T1 Thermocycler; Biometra) encontram-se descritas no quadro XXXV. A visualização dos resultados foi efectuada pela técnica de electroforese em gel de agarose 1,5%, conforme o descrito na secção 11.4.6.

**Quadro XXXV.** Condições dos ciclos de amplificação da reacção de PCR *multiplex* dirigida aos genes *mtLSU rRNA*, *SOD* e *DHFR* de *P. jirovecii*.

Condições de amplificação		
Desnaturação inicial	95°C, 10 minutos	
Desnaturação	95°C, 1 minuto	x 40 ciclos
Ligação	61,5°C, 1 minuto	
Extensão	72°C, 1 minuto	
Extensão final	72°C, 10 minutos	

### 12.5.3. Genotipagem de múltiplos SNPs por SBE

Tendo em conta que a reacção de SBE depende da amplificação fidedigna da sequência pretendida da cadeia molde, a escolha dos *primers* de SBE (SBE *primers*) é uma etapa crítica no processo de optimização desta técnica. No presente trabalho, os SBE *primers* (quadro XXXVI) foram desenhados com o objectivo de emparelharem com as sequências molde dos genes em estudo, imediatamente antes (a 5') do local de polimorfismo. As características dos SBE *primers* foram calculadas de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1) Dimensão dos oligonucleótidos entre 18 e 30 pb;
- 2) Conteúdo de GC entre 40 e 60%, sempre que possível, de forma a promover ligações estáveis;
- 3) Temperaturas de hibridação a rondarem os 55°C, com a diferença de temperatura, entre as várias sequências de oligonucleótidos, nunca superiores a 2°C;
- 4) Baixa similaridade e complementaridade entre os SBE *primers* seleccionados, para evitar reacções cruzadas não específicas (dímeros de *primers*);
- 5) Minimizar a possibilidade de estruturas secundárias, favorecendo a eficiência da ligação dos SBE *primers* às regiões homólogas da cadeia molde;
- 6) Inexistência de homologia com outras regiões genómicas de *P. jirovecii*, ou de outros organismos que possam estar presentes nas amostras, como é o caso de DNA humano, minimizando, deste modo, a ligação dos SBE *primers* a regiões de DNA inespecíficas.



Para a discriminação dos produtos de reacção, foram desenhadas sequências *TAG* distintas (quadro XXXVI), as quais foram acopladas aos SBE *primers*, obtendo-se SBE-*TAG primers*. As sequências *TAG* foram construídas tendo em conta as seguintes condições:

- 1) Garantir que as sequências possuam tamanhos distintos de forma a permitir a discriminação dos produtos pela sua dimensão;
- 2) Acautelar a ausência de complementaridade com regiões de DNA de *P. jirovecii* ou do genoma humano (também presente nas amostras), evitando a hibridação dos SBE-*TAG primers* com regiões inespecíficas;
- 3) Evitar complementaridade com as sequências dos SBE *primers*, para que não haja formação de estruturas secundárias, ou hibridação inespecífica entre as diversas sequências presentes na mistura de reacção.

**Quadro XXXVI.** Sequências nucleotídicas dos SBE-*TAG primers* utilizados para a reacção de SBE nos polimorfismos *mt85*, *SOD110*, *SOD215* e *DHFR312*. As sequências encontram-se dispostas por ordem crescente de tamanho dos fragmentos, sendo que as zonas a negrito correspondem às sequências *TAG* e as zonas sublinhadas correspondem às regiões de hibridação com a cadeia molde.

SNP	SBE- <i>TAG primer</i> (5' → 3')	Dimensão (pb)
<i>DHFR312</i>	<b>GACATGTTGATTTCTCT</b> <u>ATCTTGCATGGTACGCTCC</u>	35
<i>mt85</i>	<b>GTTGTGCTGAATTAAGCGAATAACCGTTGGCAAATTGTT</b> <u>TATTCCTCT</u>	47
<i>SOD215</i>	<b>GCAACGATGTGCGCGATTATCGCCTGGTTCATTTCGTG</b> <u>AGTTAAAAGATTTCATACGAGTTGCTAA</u>	64
<i>SOD110</i>	<b>GATGTTGCTGCGCTCGATGCAAAATACACGAAGGAG</b> <b>TTAGCTGATGCGAGGTAAATACTTTTCTTTGTTTAAAG</b>	75

Os oligonucleótidos foram desenvolvidos com recurso aos programas bioinformáticos Primer 3.0 Program (versão 0.4.0), disponível *on-line* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) e Primer Express (Applied Biosystems). As sequências *TAG* utilizadas para a reacção de SBE dos SNPs *mt85*, *SOD215* e *SOD110*, foram previamente descritas por Faber *et al.* 2005, enquanto que a sequência *TAG* para o SNP *DHFR312* foi desenvolvida no decorrer do presente estudo. Estas sequências foram desenhadas a partir de fragmentos de DNA de fago  $\lambda$ , disponíveis na base de dados do GenBank do sítio do *National Centre for Biotechnology Information's* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), garantindo a ausência de complementaridade com DNA de *P. jirovecii* ou com DNA humano, através da utilização do programa de bioinformática BLAST (versão 2.2), também disponível no sítio do *National Centre for Biotechnology Information's* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Preparação da reacção de SBE. Todas as amostras, provenientes do PCR *multiplex* foram purificadas, recorrendo-se ao tratamento enzimático com fosfatase alcalina, isolada de camarão (SAP, do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*), e exonuclease I (EXO), obtida a partir de *Escherichia coli* (USB Corporation). Assim, a cada 10  $\mu$ l de produto de reacção da PCR *multiplex* foram adicionadas 2 U de SAP e 4 U de EXO, com o respectivo tampão. A reacção decorreu a 37°C, durante 1 hora, sendo que a inactivação enzimática foi efectuada a 96°C, durante 15 minutos. Este passo permite a remoção de dNTPs e de *primers*, em excesso, provenientes da reacção de PCR *multiplex*. Enquanto a SAP degrada os dNTPs, ao remover os grupos fosfato das terminações 5', a EXO degrada os *primers*, pela sua capacidade de remoção de nucleótidos de sequências em cadeia simples, na direcção 3' para 5'.

Reacção de SBE. A análise dos resultados da reacção de SBE foi testada em duas condições diferentes:

- 1) Electroforese em gel de acrilamida;
- 2) Electroforese capilar.

Dois equipamentos distintos foram utilizados, de modo a verificar quais seriam as condições mais indicadas para detectar os resultados da reacção de SBE no formato

*multiplex*. Os resultados foram comparados de modo a definir qual a melhor metodologia a aplicar no processo experimental em curso.

**1) Electroforese em gel de acrilamida:** A reacção de SBE foi optimizada para um volume reaccional de 40 µl contendo 1x tampão de reacção (26 mM Tris-HCl [pH 9,5], 6,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Amersham Biosciences), 0,05 µM de cada ddNTP (ddUTP-JOE, ddATP-FAM, ddGTP-ROX e ddCTP-TAMRA; Jena Bioscience), 2 U da enzima de polimerização *ThermoSequenase* (Amersham Biosciences), 4 µM do SBE-TAG primer *DHFR312*, 1 µM do SBE-TAG primer *mt85*, 5 µM do SBE-TAG primer *SOD215*, 6 µM do SBE-TAG primer *SOD110*, 20 µl de produtos purificados da reacção de PCR *multiplex* e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. A reacção decorreu num termociclador (T1 Thermocycler; Biometra) com as condições térmicas descritas no quadro XXXVII.

**Quadro XXXVII.** Condições da reacção de SBE para detecção dos SNPs *mt85*, *SOD110*, *SOD215* e *DHFR312*.

Condições de SBE		
Desnaturação inicial	95°C, 3 minutos	
Desnaturação	95°C, 30 segundos	
Ligação	55°C, 30 segundos	X 55 ciclos

Os produtos da reacção de SBE foram tratados com SAP, para remoção do excesso de ddNTPs. Assim, a 5 µl de cada produto de reacção de SBE foram adicionadas 0,5 U de SAP, com o respectivo tampão, incubando-se a 37°C, durante 1 hora, sendo que a inactivação enzimática decorreu a 96°C, durante 15 minutos. Em seguida, os produtos de reacção foram preparados para serem aplicados num gel de poliacrilamida, juntando-se a 1,5 µl de cada produto de reacção SBE, tratado com SAP, 0,55 µl de tampão de aplicação e 1,95 µl de formamida desionizada (Applied Biosystems). Esta mistura foi a incubar a 96°C durante 20 minutos, seguido de arrefecimento rápido a 4°C, garantindo a desnaturação do DNA em cadeia dupla pela acção conjunta do calor e da formamida. A qualidade dos produtos de reacção foi verificada recorrendo-se a um controlo positivo, um controlo negativo e um marcador

de pesos moleculares, que foi preparado juntando-se 0,55 µl de tampão de aplicação, 0,5 µl de solução de marcador ROX-500 (Applied Biosystems), perfazendo-se o volume final (4 µl) com água desionizada estéril. Os resultados de SBE foram analisados num gel de acrilamida a 10% (*vide* Anexo II), recorrendo-se a um sequenciador automático DNA Gene Scanner 373 com o programa informático Genescan 672 (Applied Biosystems), com as seguintes condições de corrida: 1200 V, 40W, PMT: 750 V, Laser set A, durante 4 horas, em tampão TBE (pH 8,0).

**2) Técnica de electroforese capilar:** Foram seguidas as instruções específicas do fabricante (GenomeLab™ SNPStart Primer Extension Kit; Beckman Coulter). Este procedimento baseia-se num conjunto de reagentes próprios para a identificação de variações simples, ou múltiplas, de DNA (ex. SNPs), pela técnica de SBE. A reacção de SBE foi optimizada para um volume final de 15 µl, contendo 4 µl de mistura de reacção concentrada (SNPStart Master Mix), com os ddNTPs acoplados aos respectivos fluorocromos (ddATP-D1, ddCTP-D2, ddGTP-D3 e ddTTP-D4; WellRED Dye-Labeled Phosphoramidites), 5,6 µM do SBE-TAG primer *DHFR312*, 0,45 µM do SBE-TAG primer *mt85*, 2,25 µM do SBE-TAG primer *SOD215*, 2,7 µM do SBE-TAG primer *SOD110*, 5 µl de produtos purificados da reacção de PCR *multiplex* e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. A reacção decorreu num termociclador (T1 Thermocycler; Biometra) com as condições térmicas descritas no quadro XXXVII.

Os produtos da reacção de SBE foram tratados com SAP, tal como referido anteriormente, para a técnica de electroforese em gel de acrilamida. De seguida, os produtos de reacção foram preparados para sequenciação de SNPs por SBE, num sequenciador automático de capilares. A qualidade dos produtos de reacção foi verificada recorrendo-se a um controlo positivo, um controlo negativo e um marcador molecular interno. Assim, a 3 µl de produto de reacção, tratado com SAP, foram adicionados 39 µl de solução de aplicação e 0,5 µl de solução de marcador molecular interno (Size Standard 80), ambas fornecidas pelo fabricante (Beckman Coulter). A mistura foi aplicada numa placa de leitura e, em cada poço, foi adicionada uma gota de óleo mineral, que fez uma camada superficial. Os resultados de reacção foram analisados num sequenciador automático de capilares CEQ 8000-XL (Beckman Coulter), com os seguintes parâmetros de análise: programa de sequenciação SBE

(SNP-1), pré-aquecimento dos capilares a 50°C, desnaturação a 90°C durante 1 minuto, com voltagem de injeção de 2 kV durante 30 segundos, e voltagem de separação de fragmentos a 6 kV durante 1 minuto, para um tempo total de separação de 16 minutos.

#### **12.5.4. Aplicação da técnica de DNA *pooling* para genotipagem de SNPs por PCR *multiplex*/SBE**

Devido à necessidade de utilizar uma técnica de quantificação de DNA exacta e precisa, foi adaptado e desenvolvido um modelo experimental baseado numa reacção de RT-PCR específica, para quantificação de DNA de *P. jirovecii*. A optimização da metodologia de DNA *pooling* seguida de PCR *multiplex*/SBE foi repartida em seis fases:

- 1) Selecção da técnica de quantificação de DNA;
- 2) Validação da técnica de quantificação de DNA;
- 3) Desenvolvimento de uma amostra padrão;
- 4) Preparação dos *pools* de DNA de *P. jirovecii*;
- 5) Determinação das frequências dos SNPs nos *pools* em estudo;
- 6) Estudo da correlação entre os SNPs e os parâmetros clínicos da PPc.

**1) Selecção da técnica de quantificação de DNA:** Em primeiro lugar, procedeu-se à escolha e apreciação da metodologia mais indicada para a quantificação de DNA de *P. jirovecii* em isolados clínicos. O tipo de amostras utilizadas no presente estudo (secreções pulmonares) apresenta dificuldades acrescidas, quando se pretende estabelecer, com exactidão e precisão, a quantidade de DNA de um organismo específico, presente num determinado isolado. Enquanto que em estudos onde são utilizadas amostras puras, provenientes de culturas, ou de tecidos, a quantificação de DNA não sofre qualquer interferência de DNA exógeno, nos LBA e nas EI, a presença de uma grande diversidade de DNA, quer humano, quer de microrganismos presentes no pulmão, dificulta a quantificação do DNA de *P. jirovecii*. Logo, esta quantificação, numa secreção pulmonar, não pode ser feita de forma directa ao DNA total da amostra. Para quantificação do DNA de *P. jirovecii* nos isolados em estudo, foi seleccionada a técnica de RT-PCR, previamente descrita por Rohner *et al.* 2009, que demonstra alta

especificidade e sensibilidade, ultrapassando-se, deste modo, a interferência do restante DNA, proveniente de outras fontes, que não *P. jirovecii*.

**2) Validação da técnica de quantificação de DNA:** No estudo de Rohner *et al.* 2009, foram desenvolvidas duas RT-PCRs, uma dirigida para o gene  $\beta$  *TUB* e outra para o gene *KEX1*, ambos genes nucleares de cópia única. Nesse estudo, a RT-PCR com *primers* dirigidos para o *locus KEX1* demonstrou ser a metodologia mais sensível para a detecção de DNA de *P. jirovecii* (quadro XXXVIII).

**Quadro XXXVIII.** Sequências nucleotídicas dos *primers* e sonda TaqMan MGB, do inglês *minor-groove binding probes*, utilizados para quantificação absoluta de DNA de *P. jirovecii* por RT-PCR. O ensaio foi desenhado por Rohner *et al.* 2009 para a detecção e quantificação de uma sequência genética nuclear específica de *P. jirovecii* (*KEX1*).

Oligonucleótido	Sequência (3'→5')	Dimensão (pb)	Marcação
RT_KEX1Fw	CAACCCTGTTCCAATGCCTAA	21	Nenhuma
RT_KEX1Rw	CAACACCGATTCCACAAACAGT	22	Nenhuma
RT_KEXProbe	TGCTGGTGAAGTAGCTGCCGTTCTGA	25	FAM

Após selecção da RT-PCR, dirigida para o gene nuclear de cópia única *KEX1* (*KEX1* RT-PCR), seguiu-se a sua validação como técnica de quantificação absoluta de DNA de *P. jirovecii* nos isolados clínicos do presente estudo. A *KEX1* RT-PCR foi testada em três isolados de *P. jirovecii*, com detecção parasitológica e molecular positiva (controlos positivos), nas diluições 1:1, 1:10, 1:20 e 1:40, tendo decorrido num termociclador de RT-PCR (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems).

*KEX1* RT-PCR. O procedimento foi efectuado de acordo com os protocolos comerciais do fabricante (Applied Biosystems). Assim, por cada amostra, para um volume final de 20 µl, preparou-se uma mistura de amplificação contendo 1x mistura de reacção (TaqMan® Gene Expression Master Mix), que contém a enzima de polimerização (AmpliAq Gold), o respectivo tampão de reacção, Uracilo-DNA Glicosidase (UDG), dNTPs incluindo desoxiuridina trifosfato (dUTP) e ROX como fluorescência passiva, que fornece uma referência interna, permitindo a normalização do

sinal do repórter, 1x solução de ensaio (Assay Mix), que contém os respectivos *primers* e a sonda TaqMan MGB com marcação FAM, e, 9 µl de DNA diluído em água desionizada estéril.

A sonda TaqMan MGB tem incorporada na extremidade 5' um marcador fluorescente (repórter) e uma molécula não fluorescente na extremidade 3' (*quencher*), que interacciona com o marcador fluorescente, capturando o seu sinal, não se detectando fluorescência quando não há reacção. Após a reacção de amplificação o repórter liberta-se da acção do *quencher*, emitindo fluorescência, proporcional à quantidade dos produtos de amplificação. A propriedade MGB estabiliza a hibridação das sondas com a sequência alvo, aumentando a temperatura de desnaturação, o que optimiza o desenho de sondas de pequenas dimensões [Kutyavin *et al.* 2000].

O patamar de detecção (*baseline*), ciclos de PCR em que há acumulação do sinal de fluorescência da molécula repórter, sem que se atinja o limite de detecção, foi considerado entre os ciclos 3 e 15. O ponto de detecção significativo (*threshold*), nível arbitrário de fluorescência escolhido em função da *baseline*, no qual a fluorescência da molécula repórter é maior do que a fluorescência de ruído (*background*), foi estabelecido para 0,02. As condições de amplificação estão descritas no quadro XXXIX.

**Quadro XXXIX.** Condições térmicas aplicadas na *KEX1* RT-PCR, para detecção e quantificação de DNA de *P. jirovecii*.

Condições de reacção		
Activação da UDG	50°C, 2 minutos	
Desnaturação inicial	95°C, 10 minutos	
Desnaturação	95°C, 15 segundos	x 60 ciclos
Ligação/Extensão	60°C, 1 minuto	

O passo inicial de 2 minutos a 50°C é fundamental para uma actividade óptima da Uracilo-DNA Glicosidase (UDG). Esta enzima permite um tratamento preventivo das sequências, ao evitar a amplificação de subprodutos que contenham uracilo. Esta metodologia, que engloba a UDG e o dUTP como componentes da mistura de reacção da RT-PCR, é largamente utilizada para impedir que haja propagação de sequências resultantes de reacções inespecíficas, evitando a sua amplificação pela

RT-PCR e a consequente obtenção de falsos positivos. A UDG hidrolisa o uracilo incorporado quer nas sequências de DNA em cadeia dupla, quer nas sequências de DNA em cadeia simples, prevenindo a amplificação de subprodutos que, eventualmente, possam ser formados por reacções inespecíficas, as quais podem ocorrer anteriormente à reacção de RT-PCR. As cadeias nucleotídicas com uracilo são clivadas, tornando-se impossível a sua amplificação pela polimerase, impedindo-se, desta forma, a propagação de eventuais contaminações, e permitindo, apenas, a amplificação de sequências alvo genuínas [Longo *et al.* 1990; Rys & Persing 1993]. O segundo passo de 10 minutos a 95°C, para além de garantir a desnaturação da cadeia dupla de DNA, permite a inactivação da UDG e a activação da AmpliTad Gold, uma enzima de polimerização modificada quimicamente para actuar, somente, após ser submetida às condições descritas no passo de desnaturação inicial.

**3) Desenvolvimento de uma amostra padrão:** Devido à *KEX1* RT-PCR permitir a quantificação absoluta de DNA de *P. jirovecii*, a determinação das quantidades exactas de DNA do microrganismo nas amostras individuais, foi determinada recorrendo-se à comparação dos resultados da quantificação absoluta do gene *KEX1* de *P. jirovecii* nos diversos isolados, com uma amostra padrão. Este padrão foi desenvolvido tendo por base a necessidade de ter uma referência, com quantidades conhecidas e padronizadas do gene *KEX1*, o que torna possível, o cálculo da quantidade desse gene nos isolados em estudo. Para esse fim, realizou-se uma PCR para amplificação do gene *KEX1* (*vide* secção 11.4.7), em 15 amostras com identificação parasitológica e detecção molecular positivas para *P. jirovecii*, seleccionadas de forma aleatória. Com recurso ao programa bioinformático CLUSTAL W2 (versão 2.0.12), disponível no sítio do *European Bioinformatics Institute* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), foi garantido que os *primers* e a sonda da *KEX1* RT-PCR são parte integrante do fragmento amplificado pela PCR utilizada. Os 15 produtos de PCR foram analisados por corrida electroforética em gel de agarose (*vide* secção 11.4.6). Após purificação (*vide* secção 11.4.7), os produtos de PCR foram juntos e, posteriormente, diluídos em várias alíquotas, efectuando-se a quantificação de DNA total dos produtos de purificação, pelo método fluorométrico de quantificação de DNA em cadeia dupla (dsDNA, do inglês *double*



*strand DNA*) por incorporação de um marcador fluorescente (PicoGreen) (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA; Invitrogen).

Quantificação pelo PicoGreen. Efectuam-se diluições seriadas, em triplicado, dos produtos de PCR purificados (*KEX1*) (1:20, 1:40, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:5x10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup> e 1:5x10<sup>6</sup>) em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Em paralelo, a partir de uma solução diluída a 1:50 em tampão TE, fazem-se diluições seriadas de DNA de fago  $\lambda$ . Numa placa de leitura de 96 poços (UV Star Microplate; Greiner Bio-One), a cada 50  $\mu$ l de amostra é adicionada igual quantidade de PicoGreen (1:200) diluído em tampão TE. A reacção decorre em câmara escura, à temperatura ambiente, durante uma hora. A leitura da fluorescência é efectuada num leitor de microplacas (Zenyth 3100; Anthos), entre 502 e 523 nm. A curva de calibração é fornecida pelos resultados de fluorescência das diluições de DNA de fago  $\lambda$ , com concentrações conhecidas (0 ng/ml, 2,5x10<sup>-4</sup> ng/ml, 2,5x10<sup>-3</sup> ng/ml, 2,5x10<sup>-2</sup> ng/ml, 2,5x10<sup>-1</sup> ng/ml, 2,5 ng/ml, 25 ng/ml). Tendo por base a curva de calibração, determinam-se as concentrações das diluições dos produtos de PCR do *locus KEX1*.

**4) Preparação dos *pools* de DNA de *P. jirovecii*:** A quantificação de DNA de *P. jirovecii* nos isolados em estudo foi efectuada com base na relação entre a concentração das diluições dos produtos de PCR de *KEX1* e os respectivos ciclos limite de amplificação ( $C_T$ , do inglês *threshold cycles*), determinados por RT-PCR. Cada isolado individual foi diluído (1:20) e o respectivo  $C_T$  foi determinado. O ciclo limite de amplificação, ou  $C_T$ , é definido como o número fracionário de ciclos de amplificação em que o sinal da fluorescência do repórter é superior ao ponto de detecção significativo, ou *threshold*. Os  $C_T$ , ciclos onde se verifica o aumento significativo na quantidade de produto amplificado, correlacionam-se com a quantidade inicial de cadeia molde, e podem ser calculados com o auxílio do programa bioinformático do 7300 Real-Time PCR System da Applied Biosystems. A relação entre a concentração de produtos de amplificação do gene *KEX1* e os  $C_T$  é traduzida por uma curva que permite o cálculo da concentração de DNA de *P. jirovecii* nos isolados, através da determinação dos respectivos  $C_T$ . Conhecidas as concentrações de DNA de *P. jirovecii*, por isolado, agrupam-se quantidades proporcionais de cada um desses

isolados no respectivo *pool*, considerando sempre as características dos grupos em estudo.

**5) Determinação das frequências dos SNPs nos *pools* em estudo:** Os polimorfismos de cada *pool* são analisados pela técnica de SBE por electroforese capilar. Cada reacção de SBE é traduzida por um gráfico, no qual, se observam picos de fluorescência na vizinhança das dimensões 35 nt (nucleótidos), 47 nt, 64 nt e 75 nt, correspondentes a cada um dos SNPs em estudo (*DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110*, respectivamente). A importância dos SNPs em cada um dos *pools* pode ser determinada pelo cálculo da frequência relativa das alturas máximas dos picos de sequenciação obtidos nas reacções de SBE.

**6) Estudo da correlação entre os SNPs e os parâmetros clínicos da PPc:** Após determinação das frequências dos SNPs de *P. jirovecii* nos *pools* em estudo, procede-se à análise estatística de correlação entre os resultados obtidos. Assim, averiguam-se as variações na distribuição de SNPs observadas nos diversos *pools* constituídos por isolados de *P. jirovecii*, obtidos a partir de casos de PPc com diferentes características clínicas. Aplica-se o teste *t* de Student para comparar resultados médios de duas amostras independentes, considerando que estas respeitam uma distribuição normal, ou de Gauss. Estabelece-se um intervalo de confiança de 95%, de onde resultam valores estatisticamente significativos, quando o resultado do teste é inferior ou igual a 0,05. No presente estudo foram distinguidos os seguintes níveis de significância:  $P \leq 0,05$  (A);  $P \leq 0,01$  (B);  $P \leq 0,005$  (C);  $P \leq 0,001$  (D).

## 12.6. Resultados

Os objectivos desta fase do processo de investigação dividiram-se em dois pontos essenciais:

- 1) Optimização e validação de um método associado de PCR *multiplex*/SBE para análise de polimorfismos genéticos de *P. jirovecii* potencialmente relacionados com parâmetros clínicos da pneumocistose;
- 2) Desenvolvimento de uma técnica de *DNA pooling* para acelerar e maximizar o rendimento do processo de genotipagem de isolados de *P. jirovecii*, em grande escala.

Inúmeros factores como o desenho dos oligonucleótidos, as concentrações de reagentes nas diversas misturas de reacção e a capacidade do equipamento utilizado, influenciaram a optimização de todo o processo experimental.

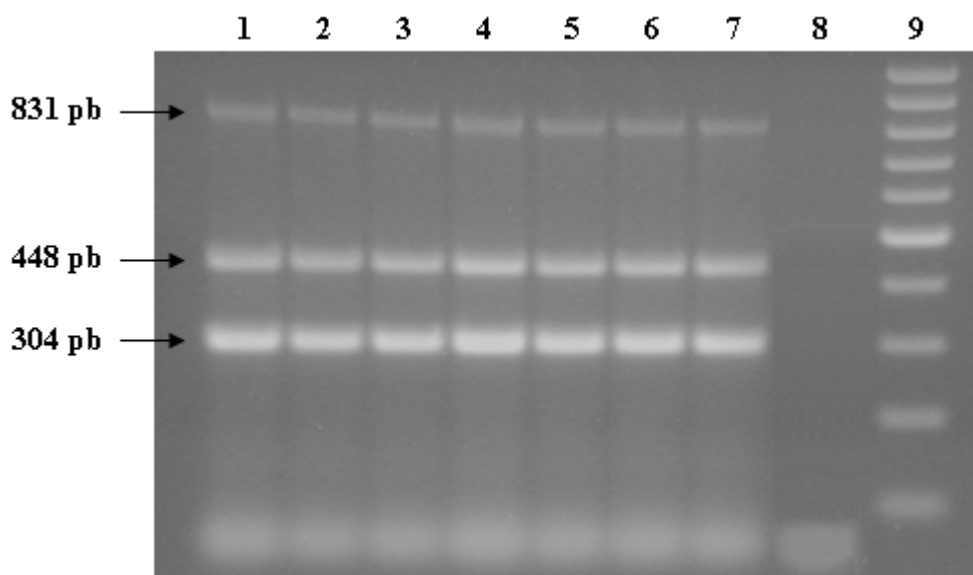
### 12.6.1. Análise da amplificação de três *loci* de *Pneumocystis jirovecii* por PCR *multiplex*

Do processo de selecção de SNPs e de desenvolvimento dos *primers*, resultou a optimização de uma reacção de PCR *multiplex*, que ao ser aplicada a uma amostra contendo DNA de *P. jirovecii*, permitiu a amplificação simultânea dos três *loci* identificados como os mais relevantes (*mtLSU rRNA*, *SOD* e *DHFR*), durante a primeira fase do trabalho. A validação desta metodologia incluiu três passos determinantes:

- 1) Amplificação isolada de cada uma das regiões genómicas por PCR simples;
- 2) Optimização da reacção de PCR *multiplex* para amplificação simultânea dos três *loci*, de forma a melhorar a nitidez e a intensidade das bandas, observadas por corrida electroforética em gel de agarose, garantindo a qualidade dos resultados das técnicas associadas (SBE e *DNA pooling*);
- 3) Amplificação das três regiões genómicas, numa só reacção de PCR (PCR *multiplex*), nas amostras clínicas consideradas para o estudo.

Após a reacção de PCR *multiplex* em isolados de *P. jirovecii*, verificou-se a presença dos três amplicões, com as dimensões pretendidas. Os produtos da reacção de

PCR *multiplex* foram analisados por separação electroforética em gel de agarose (*vide* secção 11.4.6), estando ilustrados na figura 20.



**Figura 20.** Fotografia dos produtos de amplificação por PCR *multiplex* dos genes *mtLSU rRNA* (304 pb), *SOD* (448 pb) e *DHFR* (831 pb), de isolados de *P. jirovecii*, após separação por electroforese em gel de agarose (2%), com brometo de etídio. Nos poços numerados de um a seis encontram-se os produtos de amplificação de seis isolados de *P. jirovecii*, nos poços sete e oito os controlos positivo e negativo, respectivamente, e, no poço nove o marcador de pesos moleculares (100 pb).

No total, 50 isolados, previamente analisados e considerados positivos para *P. jirovecii* por PCR *nested*, obtidos de doentes seropositivos para VIH com casos confirmados de PPc (25 isolados; 50%), com apresentação clínica atípica de PPc (10 isolados; 20%), com infecção subclínica de *P. jirovecii* (10 isolados; 20%) e de doentes seronegativos para VIH, com outras causas de imunossupressão (5 isolados; 10%), foram submetidos à técnica de PCR *multiplex*. Foi possível a amplificação dos três fragmentos, correspondentes aos *loci* em estudo, em todos os isolados. Ao serem analisados isolados de todos estes grupos, garantiu-se a qualidade dos resultados da técnica associada a aplicar posteriormente (SBE).

A validação da técnica foi garantida, não só pela dimensão dos fragmentos obtidos, mas também, por sequenciação directa. Após amplificação por PCR *multiplex*

dos três genes de interesse, os produtos de reacção de 32 (64%) amostras, seleccionadas de forma aleatória, foram purificados, a partir do gel de agarose, e foi efectuada a caracterização e identificação dos amplicões por sequenciação directa e análise dos fragmentos, tal com o descrito na secção 11.4.7. Os resultados de sequenciação confirmaram a presença dos genes *mtLSU rRNA*, *SOD* e *DHFR* de *P. jirovecii*.

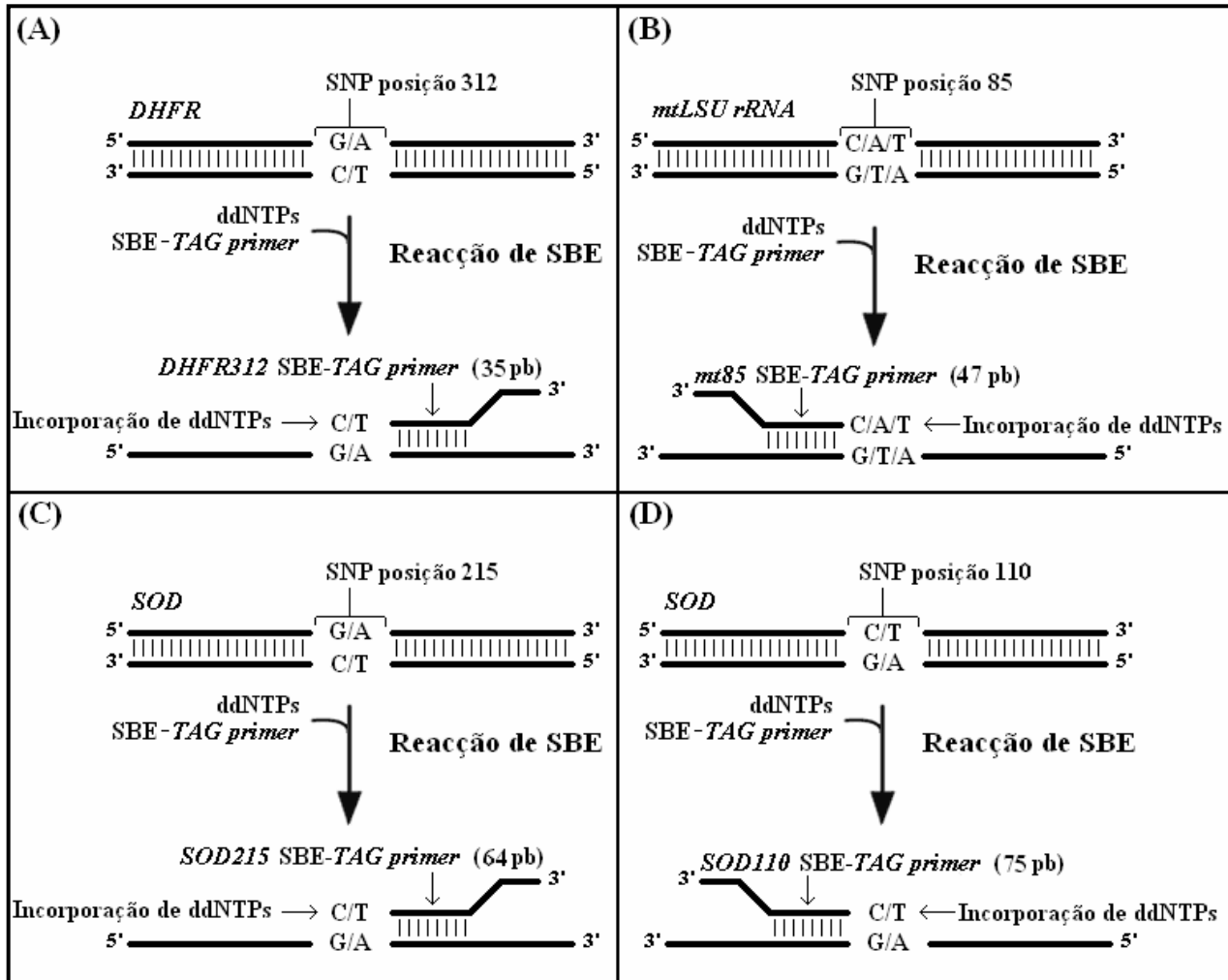
### 12.6.2. Análise da genotipagem de múltiplos SNPs por SBE

A análise da técnica de SBE compreendeu a optimização e a validação dos dois métodos aplicados (leitura de resultados por electroforese em gel de acrilamida e por electroforese capilar). O processo de optimização da reacção SBE, em formato *multiplex*, incluiu a determinação das condições térmicas dos ciclos de reacção e das concentrações dos diversos reagentes presentes na mistura reaccional. O número de ciclos aplicado foi optimizado de modo a conseguir uma melhor intensidade e nitidez de sinal. A concentração de cada SBE-TAG *primer* foi optimizada com vista a evitar, ao máximo, a formação de produtos inespecíficos e com a intenção de obter produtos de reacção com intensidades de fluorescência semelhantes, numa gama fácil de determinar, permitindo, assim, uma melhor análise dos resultados.

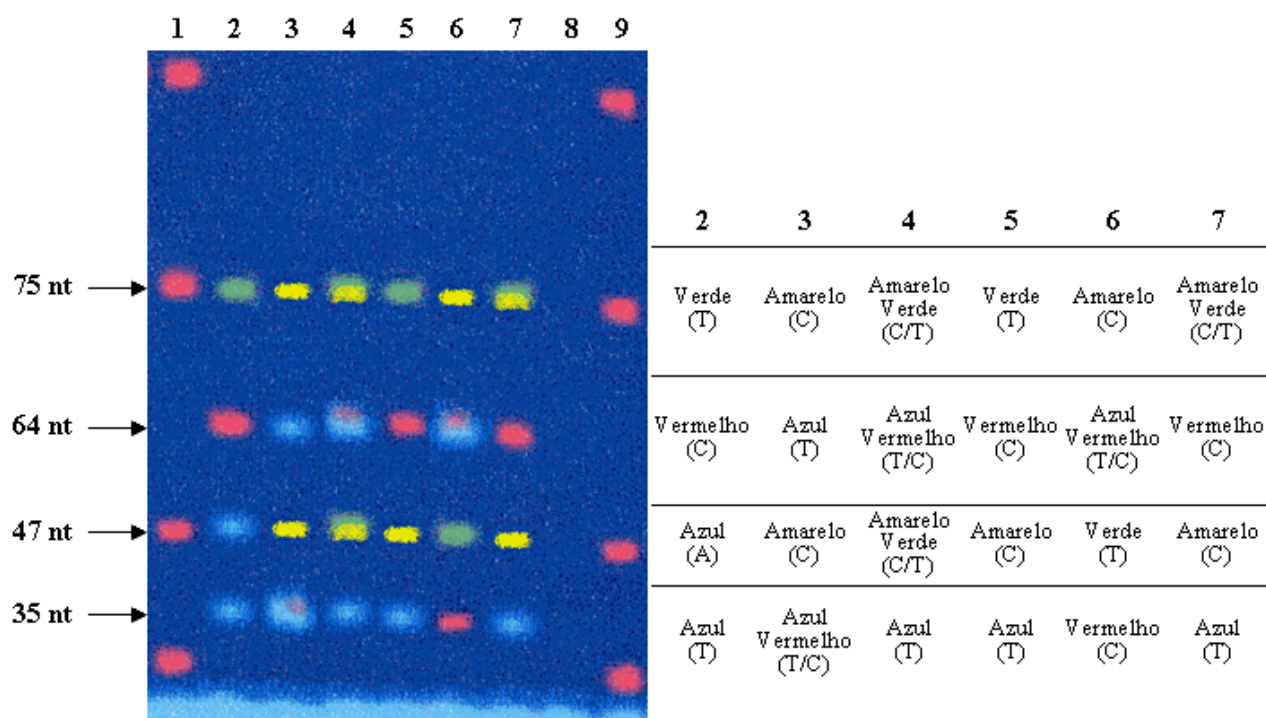
A aplicação da técnica de SBE aos produtos de reacção da PCR *multiplex* permitiu a visualização de quatro picos distintos, relativos a bandas com diferentes tamanhos, correspondentes aos quatro SBE-TAG *primers* utilizados (*DHFR312* SBE-TAG 35 pb, *mt85* SBE-TAG 47 pb, *SOD215* SBE-TAG 64 pb e *SOD110* SBE-TAG 75 pb), quer pela técnica de electroforese em gel de acrilamida, quer pela técnica de electroforese capilar. Observaram-se também as diferentes fluorescências, correspondentes à incorporação dos fluorocromos que identificam os SNPs em estudo (figura 21).

Na técnica de electroforese em gel de acrilamida, verificou-se a presença de fragmentos com 35 nt com fluorescência azul pela incorporação de ddATP ou vermelha pela incorporação de ddGTP, correspondentes aos SNPs *DHFR312T* e *DHFR312C*, respectivamente. Os fragmentos com 47 nt apresentaram fluorescência amarela (ddCTP), azul (ddATP), ou verde (ddTTP), conforme a presença dos SNPs *mt85C*, *mt85A*, ou *mt85T*. A detecção de fragmentos com 64 nt com fluorescência azul pela incorporação de ddATP ou vermelha pela incorporação de ddGTP, revelaram a presença

dos SNPs *SOD215T* ou *SOD215C*, respectivamente. Os fragmentos com 75 nt que emitiam fluorescência amarela pela incorporação de ddCTP ou verde pela incorporação de ddTTP, correspondiam aos SNPs *SOD110C* ou *SOD110T*. A figura 22 reproduz os resultados de genotipagem por SBE analisados por corrida electroforética em gel de acrilamida.



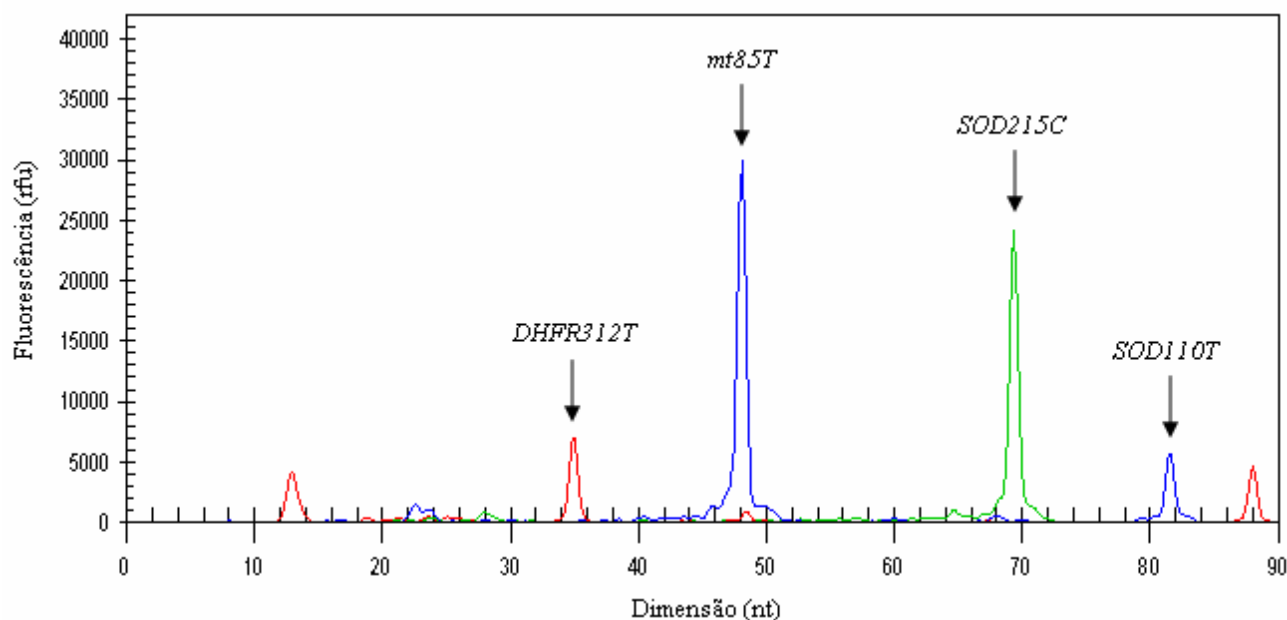
**Figura 21.** Esquema representativo da técnica de SBE em *multiplex*, utilizada para a identificação dos SNPs de *P. jirovecii* em estudo. Em A encontra-se representada a reacção de SBE para o SNP *DHFR312*, em B a reacção de SBE para a identificação do SNP *mt85*, em C a reacção de SBE para o SNP *SOD215* e em D a reacção de SBE para o SNP *SOD110*.



**Figura 22.** Fotografia dos produtos de genotipagem por SBE de isolados de *P. jirovecii*, captada através da separação de fragmentos por electroforese em gel de acrilamida (10%). Nos poços um e nove encontra-se o marcador de pesos moleculares (ROX-500; Applied Biosystems), com as bandas características aos 25 nt, 50 nt, 75 nt e 100 nt. Os poços dois a sete correspondem a corridas de produtos de SBE de isolados de *P. jirovecii*, enquanto que o poço oito corresponde ao controlo negativo. À direita, a legenda da fotografia indica os resultados obtidos pela electroforese em gel de acrilamida realizada aos produtos de SBE nos poços dois a sete, incluindo a fluorescência observada e a natureza dos SNPs analisados.

Por outro lado, na técnica de electroforese capilar, os picos detectados com fluorescência vermelha (ddATP) ou verde (ddGTP) nos 35 nt, correspondem aos SNPs *DHFR312T* e *DHFR312C*. Os picos com 47 nt detectados pelos fragmentos com fluorescência amarela (representados a preto nos gráficos de sequenciação SBE por electroforese capilar) (ddCTP), vermelha (ddATP), ou azul (ddTTP), dizem respeito aos SNPs *mt85C*, *mt85A* e *mt85T*. Os fragmentos com 64 nt detectados pelos picos com fluorescência vermelha (ddATP) ou verde (ddGTP), correspondem aos SNPs *SOD215T*

ou *SOD215C*. Por fim, os picos dos fragmentos detectados nos 75 nt, com fluorescência amarela (ddCTP) ou azul (ddTTP), revelaram a presença dos SNPs *SOD110C* ou *SOD110T*. A figura 23 demonstra os resultados típicos de genotipagem por SBE, recorrendo ao método de análise de fragmentos por electroforese capilar.



**Figura 23.** Gráfico de genotipagem por SBE de um isolado de *P. jirovecii*, obtido por separação de fragmentos através da técnica de sequenciação automática por electroforese capilar. Os picos aos 13 nt e aos 88 nt (vermelho) correspondem ao marcador de pesos moleculares (Size Standard 80; Beckman Coulter). Os SNPs podem ser identificados pelos picos: 35 nt (vermelho) *DHFR312T*, 48 nt (azul) *mt85T*, 69 nt (verde) *SOD215C* e 81 nt (azul) *SOD110T*.

Quer a técnica electroforese em gel de acrilamida, quer a técnica de electroforese capilar, permitem a identificação dos SNPs, inclusive quando se está perante isolados que apresentam mais do que um nucleótido por base, ou seja, amostras com mais do que um subtipo de organismos de *P. jirovecii* (infecções mistas).

No total, 32 isolados de *P. jirovecii* foram testados, em triplicado, para ambos os métodos. Os isolados seleccionados, correspondem a amostras previamente genotipadas para os quatro SNPs, permitindo, desta forma, a comparação entre estes dois métodos e uma técnica de referência, a sequenciação directa (quadro XL). Os dados obtidos



permitiram verificar uma concordância de resultados, em relação à sequenciação directa, de 91% para a técnica de electroforese em gel de acrilamida e de 94% para a técnica de electroforese capilar, isto é, dos 32 isolados sequenciados, 29 demonstraram resultados iguais entre a sequenciação directa e os produtos de SBE analisados pela técnica de electroforese em gel de acrilamida, e 30 apresentaram resultados iguais entre a sequenciação directa e os produtos de SBE analisados pela técnica de electroforese capilar.

Nas diferenças observadas, a técnica de electroforese em gel de acrilamida não correspondeu aos resultados da sequenciação directa em quatro SNPs, distribuídos pelas amostras Pj753 (*mt85A* em vez de *mt85C*), Pj949 (*SOD110T* em vez de *SOD110T*) e Pj1247 (*DHFR312T* e *mt85C* em vez de *DHFR312C* e *mt85A*). Por outro lado, a técnica de electroforese capilar apenas não correspondeu aos resultados da sequenciação directa em duas bases, relativas às amostras Pj753 (*mt85A* em vez de *mt85C*) e Pj1121 (*mt85A* em vez de *mt85T*). É interessante verificar que, entre as diferenças registadas, existe uma que é comum nos dois métodos de SBE, sugerindo que, possivelmente, para o SNP *mt85* do isolado Pj753, as técnicas SBE tenham demonstrado maior sensibilidade, quando comparadas com a sequenciação directa. Num total de 128 bases nucleotídicas estudadas pelas três metodologias, a sequenciação por SBE diferiu da sequenciação directa em quatro bases (3%) pela técnica de electroforese em gel de acrilamida, e em duas bases (2%) pela técnica de electroforese capilar, permitindo concluir que a técnica SBE funciona de uma forma eficaz. Deste modo, a visualização das reacções de SBE por electroforese capilar, foi considerada como a metodologia mais indicada, sendo seleccionada para a determinação genotípica de diferentes polimorfismos em simultâneo, a aplicar na técnica associada de DNA *pooling*.

**Quadro XL.** Comparação dos resultados obtidos na genotipagem dos polimorfismos *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110*, em 32 isolados de *P. jirovecii*, de acordo com a técnica de sequenciação directa e as duas técnicas de SBE utilizadas.

Isolado	Sequenciação directa				Técnica de electroforese em gel de acrilamida				Técnica de electroforese capilar			
	<i>DHFR</i>	<i>mt</i>	<i>SOD</i>	<i>SOD</i>	<i>DHFR</i>	<i>mt</i>	<i>SOD</i>	<i>SOD</i>	<i>DHFR</i>	<i>mt</i>	<i>SOD</i>	<i>SOD</i>
	312	85	215	110	312	85	215	110	312	85	215	110
Pj307	T	C/T	C/T	C/T	T	C/T	C/T	C/T	T	C/T	C/T	C/T
Pj312	T	C/T/A	C/T	C	T	C/T/A	C/T	C	T	C/T/A	C/T	C
Pj683	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj703	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	T	C
Pj718	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj727	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj753	T	C	T	C	T	<u>A</u>	T	C	T	<u>A</u>	T	C
Pj908	T	A	C/T	C	T	A	C/T	C	T	A	C/T	C
Pj949	T	C/A	C	T	T	C/A	C	<u>C</u>	T	C/A	C	T
Pj987	T	C	C/T	C	T	C	C/T	C	T	C	C/T	C
Pj993	T	C/A	T	C	T	C/A	T	C	T	C/A	T	C
Pj997	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	T	C
Pj1032	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj1040	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
Pj1087	T	C	C/T	C/T	T	C	C/T	C/T	T	C	C/T	C/T
Pj1088	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T	T	C
Pj1089	T	A	C/T	C	T	A	C/T	C	T	A	C/T	C
Pj1115	C/T	C	C	T	C/T	C	C	T	C/T	C	C	T
Pj1121	T	T	T	C	T	T	T	C	T	<u>A</u>	T	C
Pj1147	T	A	C/T	C	T	A	C/T	C	T	A	C/T	C
Pj1151	T	T	C	T	T	T	C	T	T	T	C	T
Pj1152	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj1156	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	T	C
Pj1171	C	A	C	T	C	A	C	T	C	A	C	T
Pj1185	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj1238	T	A	C	T	T	A	C	T	T	A	C	T
Pj1241	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj1247	C	A	T	C	<u>T</u>	<u>C</u>	T	C	C	A	T	C
Pj1248	T	A	T	C	T	A	T	C	T	A	T	C
Pj1253	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T
Pj1287	T	C/A	C	T	T	C/A	C	T	T	C/A	C	T
Pj1288	T	T/A	T	C	T	T/A	T	C	T	T/A	T	C

### 12.6.3. Análise da genotipagem por PCR *multiplex*/SBE em *pools* de DNA

No presente estudo, a técnica de PCR *multiplex*/SBE foi aplicada com sucesso a *pools* de DNA de *P. jirovecii*. Uma RT-PCR foi implementada, permitindo a quantificação do DNA de *P. jirovecii* em isolados individuais. A *KEX1* RT-PCR é especificamente dirigida para a quantificação absoluta do gene *KEX1* de *P. jirovecii* em amostras de secreções pulmonares, retirando, desta forma, qualquer interferência de DNA proveniente de outras fontes, que não *P. jirovecii*. Ao contrário do que acontece para genes nucleares, que se repetem no genoma do organismo (cópia múltipla), ou para genes não nucleares, como é o caso dos genes mitocondriais, cujo número de cópias depende da quantidade de mitocôndrias presentes no organismo, o *locus* seleccionado (*KEX1*), corresponde a um gene nuclear de cópia única. Em teoria, a quantificação de DNA apoiada nesta técnica, não sofre qualquer interferência ou oscilação de sinal, pois a cada organismo de *P. jirovecii*, corresponde uma cópia unitária do gene *KEX1*. Para validação do método, a *KEX1* RT-PCR foi testada por três vezes, em separado, com três amostras diferentes, positivas para *P. jirovecii* (controles positivos). As amostras foram testadas em triplicado e com quatro diluições diferentes (1:1, 1:10, 1:20 e 1:40) (quadro XLI). Este procedimento permitiu estimar os valores de diluição para os quais se observa linearidade no processo de amplificação e para os quais não se observa linearidade. Os valores obtidos parecem ser claramente dependentes das diluições utilizadas. Assim, foi assumido que a diluição 1:20 seria aquela que, aparentemente, apresentava o melhor compromisso para que, no estudo dos isolados individuais, se conseguissem calcular os  $C_T$ , tendo sempre em conta uma zona linear do processo de amplificação.

**Quadro XLI.** Resultados das reacções de *KEX1* RT-PCR de três amostras previamente testadas e consideradas positivas para *P. jirovecii*, com diferentes diluições.

Isolado	$C_T$ médios das respectivas diluições $\pm$ Erro padrão *			
	1:1	1:10	1:20	1:40
<b>Pj1152</b>	22,46 $\pm$ 0,05	22,58 $\pm$ 0,33	23,44 $\pm$ 0,11	24,41 $\pm$ 0,07
<b>Pj1224</b>	22,37 $\pm$ 0,14	24,59 $\pm$ 0,26	25,71 $\pm$ 0,08	26,35 $\pm$ 0,25
<b>Pj1248</b>	26,55 $\pm$ 0,17	29,13 $\pm$ 0,08	30,16 $\pm$ 0,35	31,34 $\pm$ 0,08

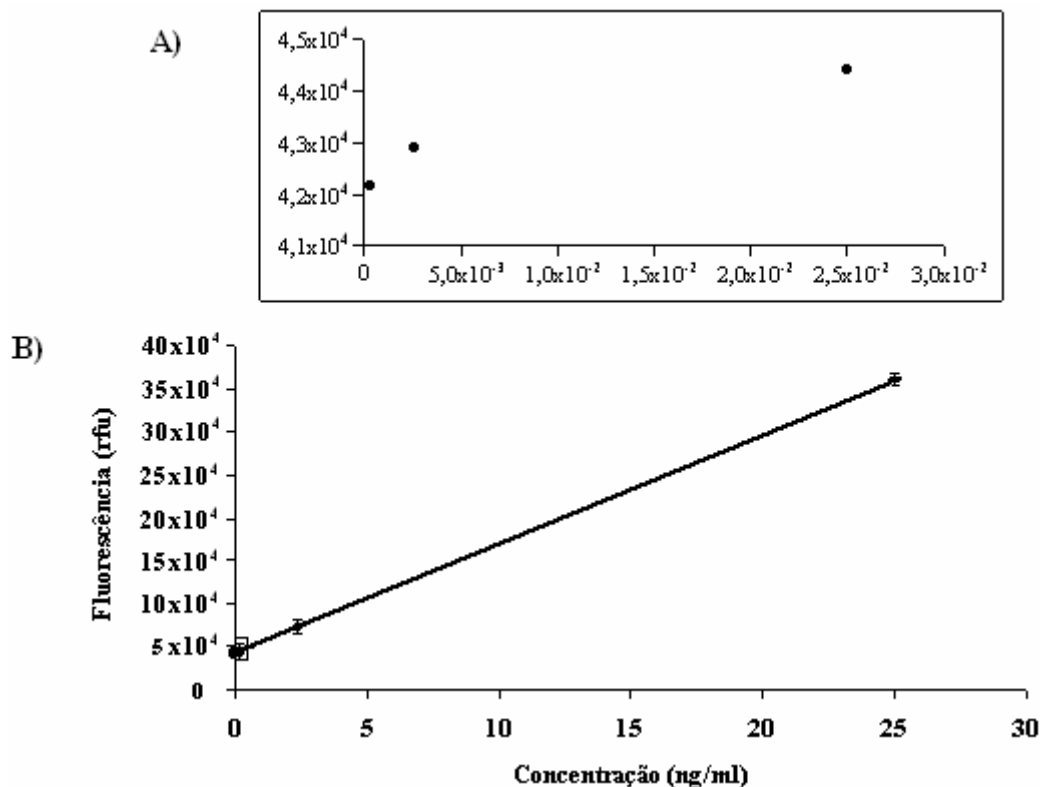
\* Os  $C_T$  foram determinados com um *threshold* de 0,02 e uma *baseline* delimitada entre os ciclos 3 e 15.

Com base na quantificação absoluta de DNA de *P. jirovecii* por RT-PCR, e para determinar, com exactidão, as quantidades de DNA do microrganismo presentes em cada um dos isolados, foi desenvolvido um padrão, com o intuito de conseguir um termo de comparação objectivo, que permitisse o cálculo da concentração do DNA de *P. jirovecii* nas diversas amostras. Foi realizada uma PCR ao *locus KEX1*, em 15 amostras positivas para *P. jirovecii*, seleccionadas de forma aleatória. De modo a garantir que apenas ficassem em solução os amplicões do gene *KEX1* de *P. jirovecii*, os produtos de PCR foram purificados, directamente a partir do gel de agarose, após separação por corrida electroforética, tal como o decrito na secção 11.4.7, impedindo, este procedimento, a presença de eventuais interferências de DNA exógeno, como por exemplo, DNA genómico de *P. jirovecii*, ou mesmo de DNA humano. Após purificação e junção dos produtos de amplificação, os resultados da quantificação do DNA total, foram determinados, recorrendo-se ao método do PicoGreen. Em primeiro lugar, calculou-se uma curva de calibração, fornecida pelos resultados de fluorescência de diluições de DNA de fago  $\lambda$ , com concentrações conhecidas (quadro XLII, figura 24).

**Quadro XLII.** Resultados de quantificação de diluições seriadas de DNA de fago  $\lambda$  pelo método do PicoGreen. A quantificação das várias séries de diluições, com concentrações conhecidas de DNA, foi realizada em triplicado, de modo a obter uma curva de calibração que fornecesse a relação entre a concentração de DNA em solução e a fluorescência, medida em rfu, do inglês *relative fluorescence units*.

Concentração de DNA de fago $\lambda$ (ng/ml)	Fluorescência média (rfu) $\pm$ Erro padrão
0	$40,6 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$
$2,5 \times 10^{-4}$	$42,1 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$
$2,5 \times 10^{-3}$	$42,9 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$
$2,5 \times 10^{-2}$	$44,4 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$
$2,5 \times 10^{-1}$	$44,5 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$
2,5	$79,3 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^3$
25	$358,8 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$

Pela equação da curva do gráfico da figura 24 pode-se determinar a concentração da amostra padrão (X), recorrendo-se aos valores de fluorescência (Y) obtidos para as várias diluições efectuadas. No presente caso, essa concentração corresponde à quantidade de gene *KEX1* de *P. jirovecii*, em solução. Em paralelo, os valores de  $C_T$ , relativos a cada uma das diluições, podem ser determinados por RT-PCR (quadro XLIII).



**Figura 24.** Representação gráfica da curva de calibração fornecida pelos resultados de fluorescência das diluições de DNA de fago  $\lambda$  com concentrações conhecidas (0 ng/ml,  $2,5 \times 10^{-4}$  ng/ml,  $2,5 \times 10^{-3}$  ng/ml,  $2,5 \times 10^{-2}$  ng/ml,  $2,5 \times 10^{-1}$  ng/ml, 2,5 ng/ml, 25 ng/ml). A curva é traduzida pela seguinte equação:  $Y = 12646 X + 43049$ , com  $R^2 = 0,9996$ , onde Y é o valor da fluorescência detectada (rfu) e X é a concentração de DNA em cadeia dupla (ng/ml). Em A, está representada uma inserção do gráfico, onde se encontram os pontos correspondentes às concentrações mais baixas de DNA de fago  $\lambda$ , enquanto que em B, estão representados os pontos correspondentes às concentrações mais elevadas. O método de quantificação foi realizado recorrendo-se a triplicados. As médias dos resultados estão representadas por pontos e os erros padrão pelas barras horizontais.

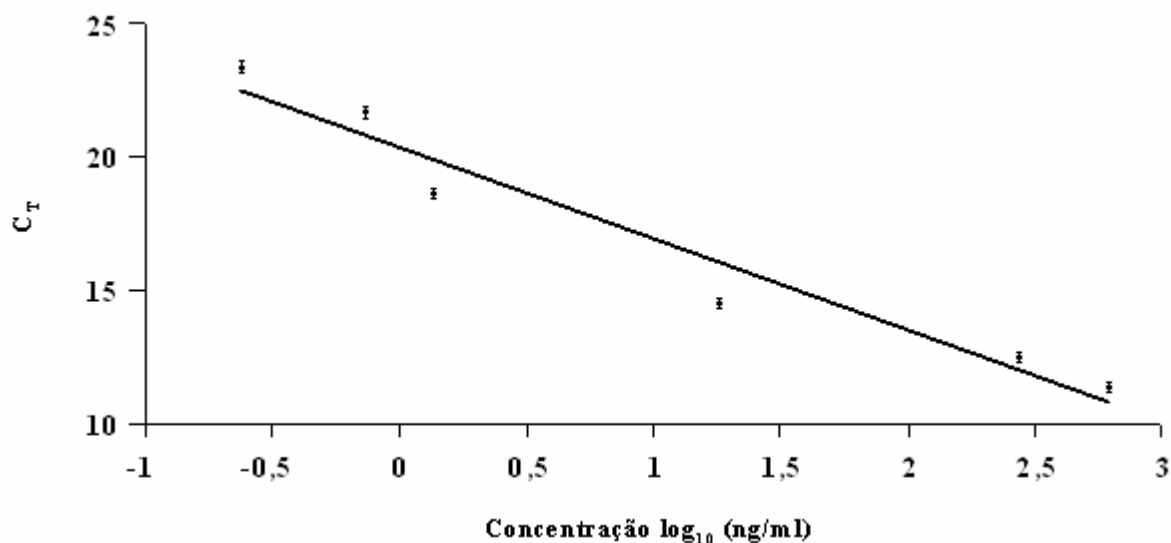
**Quadro XLIII.** Concentrações de DNA nas diversas diluições da amostra padrão e respectivos  $C_T$ . A RT-PCR foi realizada em triplicado, obtendo-se os  $C_T$  médios referentes às diversas diluições.

Diluição	Concentração de dsDNA ( <i>KEX1</i> ) (ng/ml)	$C_T$ médios $\pm$ Erro padrão
1:20	614,94	11,37 $\pm$ 0,24
1:40	272,08	12,46 $\pm$ 0,12
1:10 <sup>3</sup>	18,07	14,53 $\pm$ 0,08
1:10 <sup>5</sup>	1,37	18,64 $\pm$ 0,02
1:5x10 <sup>5</sup>	0,75	21,66 $\pm$ 0,07
1:10 <sup>6</sup>	0,24	23,36 $\pm$ 0,08
1:5x10 <sup>6</sup> *	-0,16	26,13 $\pm$ 0,05

\* O resultado da diluição 1:5x10<sup>6</sup> não foi considerado nos cálculos posteriores.

Nos resultados do quadro XLIII, a diluição 1:5x10<sup>6</sup> apresenta um resultado negativo, o qual não pode ser considerado. Muito provavelmente este resultado deve-se ao facto do limite de sensibilidade da técnica utilizada não permitir determinar a concentração na diluição 1:5x10<sup>6</sup>. Por esta razão, o resultado relativo à diluição 1:5x10<sup>6</sup> não foi considerado nos cálculos subsequentes.

O cálculo e preparação dos *pools* de DNA de *P. jirovecii*, foi possível, recorrendo-se a uma nova curva padrão que relaciona a concentração do gene *KEX1* de *P. jirovecii* e os  $C_T$  determinados por RT-PCR (figura 25). A equação da curva padrão que traduz a relação entre a concentração das diluições dos produtos de PCR de *KEX1* e os respectivos  $C_T$ , permite o cálculo da concentração de DNA de *P. jirovecii* nos isolados, através da determinação dos  $C_T$  correspondentes. Assim, para cada um dos subgrupos de isolados, foram determinadas as concentrações de DNA de *P. jirovecii*, nos isolados individuais. Cada isolado foi diluído a 1:20 e o seu  $C_T$  foi determinado por *KEX1* RT-PCR. Através da equação da curva padrão calcularam-se as respectivas concentrações de DNA de *P. jirovecii*, em cada um dos isolados. Posteriormente, agruparam-se, as respectivas quantidades de cada um desses isolados, de forma proporcional e no *pool* correspondente. No quadro XLIV estão representados os valores de concentrações médias, bem como os  $C_T$  médios, dos isolados individuais, que constituem os vários *pools*.

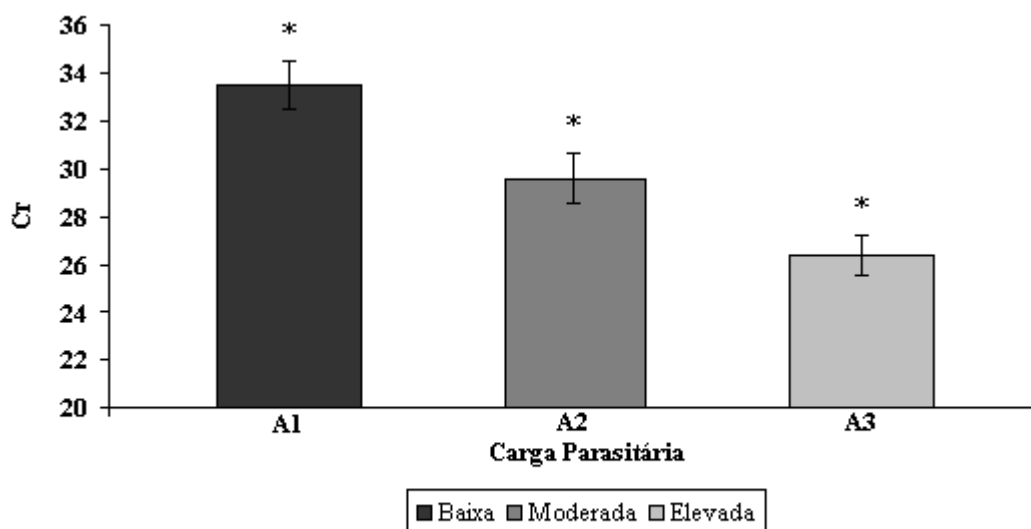


**Figura 25.** Representação gráfica da relação entre a quantidade de DNA das diluições da amostra padrão do gene *KEX1* de *P. jirovecii* e os respectivos C<sub>T</sub>, determinados por RT-PCR. A curva é traduzida pela seguinte equação:  $Y = -3,4323 \log_{10} X + 20,361$ , com  $R^2 = 0,9517$ , onde Y é o valor de C<sub>T</sub> e X é a concentração de DNA (gene *KEX1* de *P. jirovecii*; ng/ml), em solução. As médias dos resultados estão representadas por pontos e os erros padrão pelas barras horizontais.

**Quadro XLIV.** Concentrações médias de DNA e C<sub>T</sub> médios, determinados para os isolados individuais de *P. jirovecii* que constituem os subgrupos em estudo.

Pools	Concentrações médias	
	(ng/ml)	C <sub>T</sub> médios ± Erro padrão
A1	0,16	33,51 ± 1,03
A2	1,45	29,61 ± 1,06
A3	2,32	27,06 ± 0,79
B/C	0,12	34,96 ± 1,07
D	2,62x10 <sup>-4</sup>	37,13 ± 0,57
E	2,47	26,01 ± 0,56
F	0,40	28,40 ± 1,14

Os resultados obtidos permitiram ainda estabelecer as diferenças dos  $C_T$  médios dos *pools* compostos por isolados de casos de PPc confirmada laboratorialmente, com quadro clínico compatível, e com diferentes cargas parasitárias (*pools* do grupo A). Esta abordagem permitiu observar diferenças, estatisticamente significativas, entre as distribuições dos  $C_T$  médios dos três *pools* (figura 26).



\* **A1vsA2** ( $P \leq 0,01$ ); **A1vsA3** ( $P \leq 0,001$ ); **A2vsA3** ( $P \leq 0,05$ )

**Figura 26.** Representação gráfica dos  $C_T$  médios dos isolados individuais, calculados através da *KEX1* RT-PCR para os *pools* A1 (carga parasitária baixa), A2 (carga parasitária moderada) e A3 (carga parasitária elevada), bem como os resultados do teste *t*, correspondentes à análise da distribuição dos  $C_T$  médios nos três *pools*. As médias dos resultados estão representadas pela altura máxima das colunas e os erros padrão pelas barras horizontais.

No que se refere à preparação dos *pools* A1, A2, A3, E e F, cada isolado foi diluído de modo a contribuir com  $1 \times 10^{-4}$  ng de DNA de *P. jirovecii*, enquanto que nos *pools* B/C e D, cada isolado contribuiu com  $1 \times 10^{-5}$  ng. Esta diferença deve-se ao facto de que nos *pools* B/C e D, grande parte dos isolados apresentarem concentrações de DNA muito baixas, condicionando, por isso, a quantidade final, com que cada isolado pode contribuir. Com este procedimento garantiu-se que, cada uma das amostras,



contribui-se de forma proporcional com o seu DNA de *P. jirovecii* para a preparação do respectivo *pool*. No quadro XLV encontram-se as concentrações de DNA de *P. jirovecii* calculadas para os vários *pools*.

**Quadro XLV.** Concentrações de DNA de *P. jirovecii* nos diferentes *pools* em estudo.

<i>Pools</i>	Concentração (ng/ml)
A1	$3,35 \times 10^{-3}$
A2	$2,37 \times 10^{-3}$
A3	$3,18 \times 10^{-3}$
B/C	$0,31 \times 10^{-3}$
D	$0,26 \times 10^{-3}$
E	$2,31 \times 10^{-3}$
F	$4,45 \times 10^{-3}$

Os diferentes *pools* foram submetidos a PCR *multiplex*/SBE para análise dos SNPs. Foi possível observar a presença dos três amplicões em estudo (*mtLSU rRNA*, *SOD* e *DHFR*) como resultado da PCR *multiplex* aos *pools* A1, A2, A3, E e F. No entanto, a PCR *multiplex* realizada aos *pools* B/C e D não permitiu a amplificação de fragmentos, não sendo, por isso, possível a aplicação da reacção de SBE a estes dois *pools*. Nas reacções de SBE realizadas aos *pools* A1, A2, A3, E e F, foi possível observar a presença de picos de fluorescência na vizinhança das dimensões 35 nt, 47 nt, 64 nt e 75 nt, correspondentes aos SNPs *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110*, respectivamente. As frequências de cada SNP, nos respectivos *pools*, foram determinadas pelo cálculo da frequência relativa das alturas máximas dos picos obtidos por SBE (quadro XLVI). Em cada corrida, foi utilizado um controlo positivo, fornecido pelo fabricante, o qual apresentou quatro picos característicos, correspondentes a quatro dimensões moleculares distintas, sendo que, cada um desses picos representa um dos fluorocromos utilizados (fluorescência de referência) (D1, D2, D3 e D4; Beckman Coulter). Assim, em cada electroforese, é utilizado um controlo positivo com os picos 29 nt (amarelo) correspondente à citosina, 35 nt (vermelho) correspondente à adenina,

36 nt (verde) correspondente à guanina e 50 nt (azul) correspondente à timina, os quais apresentam valores de altura máxima, que podem ser utilizados como referência de fluorescência.

No final, cada valor de altura máxima de fluorescência observado nos produtos de SBE foi dividido pelo respectivo valor de fluorescência de referência, determinado em cada corrida pelo controlo positivo. Este procedimento permitiu que o resultado do cálculo das frequências relativas, de cada alelo, fosse normalizado, e que qualquer interferência proveniente de diferenças na captação de sinal entre os diferentes fluorocromos, inerente à metodologia aplicada, fosse corrigida.

**Quadro XLVI.** Frequências dos SNPs de *P. jirovecii* nos *pools* em estudo.

Frequências dos SNPs (%)									
<i>Pool</i>	<i>DHFR312T</i>	<i>DHFR312C</i>	<i>mt85C</i>	<i>mt85A</i>	<i>mt85T</i>	<i>SOD215C</i>	<i>SOD215T</i>	<i>SOD110T</i>	<i>SOD110C</i>
<b>A1</b>	90	10	11	35	55	63	37	84	16
<b>A2</b>	100	0	14	53	33	90	10	89	11
<b>A3</b>	90	10	6	46	47	52	48	65	35
<b>E</b>	90	10	6	62	32	74	26	87	13
<b>F</b>	93	7	23	26	51	78	22	85	15

As diferenças na distribuição das frequências dos SNPs, detectadas entre os diversos *pools*, foram analisadas pelo teste *t* de Student (quadro XLVII). O teste *t* permite a comparação de médias de duas amostras independentes (média das frequências dos SNPs em dois *pools* distintos), considerando que estas têm uma distribuição Gaussiana. Alguns resultados sugerem diferenças significativas na média da distribuição das frequências dos SNPs entre os *pools* considerados.

No que se refere ao SNP *DHFR312*, o alelo *DHFR312T* foi o mais frequente, entre os *pools* estudados, variando a sua frequência entre os 90% nos *pools* A1, A3 e E, os 93% no *pool* F e os 100% no *pool* A2. Por outro lado, *DHFR312C* foi menos frequente, encontrando-se entre os 10% nos *pools* A1, A3 e E, os 7% no *pool* F e os 0% no *pool* A2. A distribuição das frequências do SNP *mt85* revelou o alelo *mt85C* com 23% no *pool* F, seguido de 14% no *pool* A2, 11% no *pool* A1 e 6% nos *pools* A3 e E. O alelo *mt85A* foi mais comum no *pool* E (62%), seguido dos *pools* A2 (53%), A3 (46%), A1

(35%) e F (26%). O alelo *mt85T* foi observado com uma frequência de 55% no *pool* A1, 51% no *pool* F, 47% no *pool* A3, 33% no *pool* A2 e 32% no *pool* E. No SNP *SOD215*, o alelo *SOD215C* foi, de um modo geral, o mais frequente, entre os *pools* estudados, tendo sido mais comum no *pool* A2 (90%), seguida dos *pools* F (78%), E (74%), A1 (63%) e A3 (52%). Inversamente, *SOD215T* foi menos frequente, atingindo os 48% no *pool* A3, seguido dos 37% no *pool* A1, 26% no *pool* E, 22% no *pool* F e apenas 10% no *pool* A2. Os resultados de sequenciação SBE para o SNP *SOD110* revelaram o alelo *SOD110T* como o mais frequente, com 89% no *pool* A2, 87% no *pool* E, 85% no *pool* F, 84% no *pool* A1 e 65% no *pool* A3. O alelo *SOD110C* foi menos comum, tendo sido observado com uma frequência de 35% no *pool* A3, 16% no *pool* A1, 15% no *pool* F, 13% no *pool* E e 11% no *pool* A2.

**Quadro XLVII.** Resultados do teste *t* referentes à comparação da distribuição das frequências dos SNPs de *P. jirovecii* nos *pools* em estudo.

<i>Pools</i>	SNPs					
	<i>DHFR312T/C</i>	<i>mt85C</i>	<i>mt85A</i>	<i>mt85T</i>	<i>SOD215C/T</i>	<i>SOD110T/C</i>
<b>A1vsA2</b>	NS	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$
<b>A1vsA3</b>	NS	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$	NS	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,005$
<b>A2vsA3</b>	NS	$P \leq 0,001$	NS	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$
<b>EvsF</b>	NS	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$	NS	NS

NS:  $P > 0,05$ . Resultado estatisticamente não significativo.

Com base nos resultados do teste *t*, verificou-se que a variação na distribuição de alguns SNPs de *P. jirovecii*, entre *pools* constituídos por isolados obtidos de casos de PPc com diferentes parâmetros clínicos, foi significativa. Assim, o SNP *DHFR312* não demonstrou nenhuma diferença significativa na distribuição das suas frequências entre os diversos *pools*. Por outro lado, as frequências de distribuição do SNP *mt85* demonstraram diferenças significativas entre a maioria dos *pools*. À exceção da distribuição de frequências entre os *pools* A2 e A3, para o alelo *mt85A*, e entre os *pools* A1 e A3, para o alelo *mt85T*, todas as distribuições de frequências foram significativamente diferentes entre os *pools* em estudo. No que se refere aos SNPs *SOD215* e *SOD110*, verificaram-se diferenças significativas na distribuição das

frequências entre os *pools* A1, A2 e A3. No entanto, a diferença na distribuição de frequências destes dois SNPs nos *pools* E e F não foi significativa.

### 12.7. Discussão dos resultados

No presente trabalho, a técnica de sequenciação de SBE, associada à PCR *multiplex*, foi aplicada com sucesso na identificação de polimorfismos genéticos de *P. jirovecii*. A associação destas duas técnicas à metodologia de DNA *pooling*, demonstrou que é possível o estudo de SNPs de *P. jirovecii* num formato múltiplo, abrangendo um elevado número de amostras. Esta fase da investigação, consistiu na validação do método PCR *multiplex*/SBE em *pools* de DNA de *P. jirovecii*, preparados de acordo com características específicas dos isolados (parâmetros clínicos, cargas parasitárias e evolução clínica), de forma a diminuir o tempo de análise de diferentes polimorfismos e das suas potenciais implicações no decorrer da infecção por *P. jirovecii*. Para o desenvolvimento desta metodologia foram utilizados como modelo três genes polimórficos de *P. jirovecii*. Os genes *mtLSU rRNA*, *SOD* e *DHFR*, demonstraram ser regiões variáveis de DNA, tendo sido associados, durante a primeira fase do estudo, a características clínicas específicas da infecção. Os SNPs considerados mais relevantes nestes *loci* (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHFR312*) poderão, de alguma forma, estar associados a haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas, ou seja, potencialmente implicados em diferentes graus de severidade da infecção, ou relacionados com a evolução clínica da doença. A análise da relação entre os genótipos de *P. jirovecii* e os parâmetros da infecção (*vide* 11.6.2) permitiram verificar que os referidos SNPs são mais frequentes em casos de PPc com determinados parâmetros clínicos. Estes dados evidenciam que estas variações específicas poderão ser estudadas através de técnicas que comportem uma maior amostragem e que permitam avaliar a real importância desses SNPs em subgrupos de doentes que apresentam características clínicas com as quais os SNPs parecem estar associados. Os objectivos desta fase do estudo consistiram em:

- 1) Optimização e validação da técnica de PCR *multiplex*/SBE para a análise de SNPs de *P. jirovecii* potencialmente associados com parâmetros da PPc;
- 2) Desenvolvimento de *pools* de DNA de *P. jirovecii* para acelerar e maximizar o rendimento do processo de genotipagem em grande escala.

O sucesso da estratégia experimental, que assentou na fusão das técnicas de PCR *multiplex*/SBE com *pools* de DNA, demonstrou ser dependente de diversos factores,

destacando-se aqueles que mais influenciaram a optimização das técnicas associadas, como é o caso do desenho dos oligonucleótidos, as concentrações de reagentes nas diversas misturas de reacção e a capacidade do equipamento utilizado.

#### **12.7.1. Validação da genotipagem de SNPs de *Pneumocystis jirovecii* por PCR *multiplex*/SBE**

Através dos resultados do presente estudo, verificou-se que a técnica de PCR *multiplex* associada à sequenciação de SNPs por SBE é uma metodologia indicada para a caracterização genética de *P. jirovecii*. Como se pode observar, pelos fragmentos de amplificação da figura 20 (secção 12.6.1), a reacção de PCR *multiplex* desenvolvida no decorrer deste trabalho, demonstra ser uma técnica sensível, robusta e prática para amplificação dos três *loci* em estudo: *mtLSU rRNA* (304 pb), *SOD* (448 pb) e *DHFR* (831 pb). Com base nestes resultados, conclui-se que a PCR *multiplex* pode ser uma ferramenta importante na caracterização do perfil genético de *P. jirovecii*, permitindo a amplificação de diversos fragmentos, numa só reacção de amplificação, implicando redução de custos e de tempo de operação. Por outro lado, a reacção de SBE desenhada e avaliada no decorrer do presente estudo (*vide* 12.6.2, figuras 21, 22 e 23), demonstrou ser um método exacto de genotipagem de SNPs de *P. jirovecii*, com elevada sensibilidade, reprodutibilidade e fidelidade, levando à obtenção de resultados concordantes com os obtidos por técnicas convencionais, como é o caso da sequenciação directa. Esta técnica permite a genotipagem de SNPs de *P. jirovecii*, localizados em diferentes *loci*, numa única reacção, podendo ser aplicada num formato múltiplo, em associação com a PCR *multiplex*, contribuindo para o aumento do rendimento dos processos de genotipagem. Ao contemplar numa só reacção a análise simultânea de diversos SNPs, a SBE em formato *multiplex* permite, por um lado, o uso em larga escala, com genotipagem eficiente de um elevado número de amostras, e por outro, o aumento do rendimento de operação, obviando os custos inerentes.

#### **12.7.2. Avaliação da genotipagem de *Pneumocystis jirovecii* por PCR *multiplex*/SBE em *pools* de DNA**

No decorrer do presente estudo, foi desenvolvida uma metodologia de DNA *pooling*, a qual foi associada com sucesso à técnica de PCR *multiplex*/SBE. Os *pools* de

DNA de *P. jirovecii* foram delineados com base na técnica de RT-PCR, dirigida para a quantificação do gene *KEX1*. Depois de devidamente testada, a *KEX1* RT-PCR foi considerada uma metodologia sensível e robusta para a quantificação absoluta de DNA de *P. jirovecii* em amostras de secreções pulmonares. Para determinar, com exactidão, as quantidades de DNA presentes em cada isolado, foi desenvolvido um padrão, que permitiu o cálculo da concentração de DNA de *P. jirovecii* nas diversas amostras em estudo. A determinação de uma curva padrão que relaciona a concentração do gene *KEX1* de *P. jirovecii* e os respectivos  $C_T$  (vide 12.6.3, figura 25), determinados por RT-PCR, permitiu o cálculo da concentração de DNA de *P. jirovecii* nos isolados individuais, através da determinação dos  $C_T$  correspondentes. Assim, para cada um dos subgrupos de isolados, foram determinadas as concentrações de DNA de *P. jirovecii*, nos isolados individuais, o que permitiu o cálculo e a preparação dos respectivos *pools*.

Concentração de DNA de *P. jirovecii* nas diferentes *pools* em estudo. Com base nos valores das concentrações médias de DNA dos isolados individuais de *P. jirovecii* nos diferentes *pools* (vide 12.6.3, quadro XLIV), observou-se, tal como era esperado, que nos casos com PPc confirmada laboratorialmente, com quadro clínico compatível (grupo A), existe uma concentração média de DNA mais alta no *pool* composto por isolados com cargas parasitárias elevadas (A3; 2,32 ng/ml), seguida do *pool* constituído por isolados com cargas parasitárias moderadas (A2; 1,45 ng/ml) e, por fim, do *pool* composto por isolados com cargas parasitárias baixas (A1; 0,16 ng/ml). É de referir que as diferenças observadas na distribuição dos  $C_T$  médios dos isolados individuais, que compõem os *pools* A1, A2 e A3, foram estatisticamente significativas (vide 12.6.3, figura 26). Estes resultados vêm ao encontro dos valores das cargas parasitárias de *P. jirovecii*, determinados por IFI/AcM, confirmando, tal como era esperado, que quanto maior a carga parasitária dos isolados que compõem um *pool*, maior a concentração de DNA do parasita presente em solução. No que se refere ao *pool* composto pelo conjunto de isolados de doentes seropositivos para VIH, com apresentação clínica atípica de PPc e pelos portadores assintomáticos (B/C; 0,12 ng/ml), bem como ao *pool* formado pelos isolados de doentes seronegativos para VIH, com PPc (D;  $2,62 \times 10^{-4}$  ng/ml), verificaram-se concentrações médias de DNA relativamente baixas, o que coincide com o facto das amostras biológicas, destes *pools* de doentes,

apresentarem, tendencialmente, cargas parasitárias baixas. Este facto, tem especial relevância nos isolados do *pool* D, que, muito provavelmente, por serem obtidos de doentes seronegativos para VIH, com outras causas de imunossupressão, que de modo geral, não implicam níveis de linfócitos TCD4<sup>+</sup> tão baixos, como o que sucede perante casos de sida, demonstram, tendencialmente, cargas parasitárias muito baixas [Nevez *et al.* 1999].

É interessante verificar que as concentrações médias de DNA nos isolados do *pool* constituído por doentes seropositivos para VIH, com casos de PPc que apresentaram evolução clínica favorável (E; 2,47 ng/ml), é superior à concentração média dos isolados do *pool* de doentes seropositivos para VIH, com casos de PPc que apresentaram evolução clínica desfavorável (F; 0,40 ng/ml). Coloca-se a hipótese de que infecções por *P. jirovecii* com cargas parasitárias relativamente baixas, possam implicar uma evolução clínica menos favorável do doente. Estes resultados apontam para uma relação entre a evolução do quadro clínico e a quantidade de organismos de *P. jirovecii* presentes no pulmão do doente, em que espécimes com cargas parasitárias baixas parecem ser mais frequentes entre os casos de PPc com evolução clínica desfavorável. Esta relação entre carga parasitária baixa e evolução clínica desfavorável pode ser explicada pelo estabelecimento de uma infecção que se apresenta de forma mais insidiosa, tornando-se mais difícil de diagnosticar e de acompanhar ou, pela presença de organismos de *P. jirovecii* com características mais virulentas, que com menores cargas parasitárias estabelecem infecções de elevado grau de severidade, conduzindo a uma evolução clínica desfavorável do doente.

As baixas concentrações de DNA de *P. jirovecii*, apresentadas pelos *pools* B/C e D, reflectiram uma dificuldade acrescida na amplificação destes *pools* por PCR *multiplex*. As baixas quantidades de DNA de *P. jirovecii* em ambos os *pools*, deveu-se ao facto de grande parte dos isolados individuais apresentarem concentrações de DNA muito baixas, condicionando, por isso, a quantidade final de cada isolado nos *pools* ( $1 \times 10^{-5}$  ng). Conclui-se, desta forma, que as concentrações  $0,31 \times 10^{-3}$  ng/ml (B/C) e  $0,26 \times 10^{-3}$  ng/ml (D) ficam aquém do limiar de detecção/amplificação da PCR *multiplex*, descrita neste estudo. Por outro lado, os resultados obtidos, demonstraram que as concentrações de DNA de *P. jirovecii* dos *pools* A1 ( $3,35 \times 10^{-3}$  ng/ml), A2 ( $2,37 \times 10^{-3}$  ng/ml), A3 ( $3,18 \times 10^{-3}$  ng/ml), E ( $2,31 \times 10^{-3}$  ng/ml) e F ( $4,45 \times 10^{-3}$  ng/ml),



nas quais cada espécime foi diluído de modo a contribuir com  $1 \times 10^{-4}$  ng de DNA de *P. jirovecii*, são indicadas para a aplicação da técnica de PCR *multiplex*/SBE, desenhada no decorrer do presente estudo. No final, as reacções de SBE realizadas aos *pools* A1, A2, A3, E e F apresentaram picos de fluorescência na vizinhança das dimensões 35 nt, 47 nt, 64 nt e 75 nt, correspondentes aos SNPs *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110*, respectivamente.

Importância relativa dos SNPs nos diferentes *pools* em estudo. Os resultados das frequências relativas de cada SNP, nos respectivos *pools*, permitiram definir a importância desses SNPs na infecção por *P. jirovecii*, mais especificamente, facultaram informação acerca da distribuição das frequências dos SNPs *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110* nos subgrupos de doentes com diferentes características clínicas. A frequência de cada SNP (*vide* 12.6.3, quadro XLVI) foi determinada, em cada *pool*, recorrendo-se ao cálculo da frequência relativa das alturas máximas dos picos de sequenciação, obtidos por análise dos fragmentos de SBE por electroforese capilar, após normalização dos resultados, tomando como referência os valores de fluorescência determinados pelos controlos positivos, utilizados em cada reacção. Verificou-se que a variação na distribuição de alguns SNPs entre diferentes *pools* foi significativa (*vide* 12.6.3, quadro XLVII).

**1) *DHFR312*:** Tendo em conta os resultados obtidos para o SNP *DHFR312*, nos quais não se observou qualquer diferença significativa na distribuição das frequências de *DHFR312T* ou *DHFR312C*, entre os diversos *pools*, pode considerar-se, que, em princípio, este SNP não está relacionado com os parâmetros da infecção considerados nesta fase do estudo (carga parasitária e evolução clínica). Ao contrário do que era indicado pelos resultados da primeira fase do estudo, na qual se analisaram isolados individuais de *P. jirovecii*, e onde *DHFR312T* parecia estar relacionado com isolados com cargas parasitárias moderadas a elevadas, e *DHFR312C* com cargas parasitárias baixas, os resultados da PCR *multiplex*/SBE aos *pools* do grupos A não demonstram diferenças significativas na distribuição deste polimorfismo. De igual modo, não foram observadas diferenças significativas na distribuição das frequências de *DHFR312T* ou *DHFR312C* entre os *pools* E e F. Em qualquer dos *pools*, estudados por PCR

*multiplex*/SBE, o alelo *DHFR312T* foi o mais comum, variando a sua frequência entre os 90 e os 100%.

**2) *mt85*:** No que se refere ao SNP *mt85*, os resultados revelaram importantes diferenças na distribuição das frequências dos alelos, entre os diversos *pools*. Assim, *mt85C* foi significativamente mais comum nos *pools* A1 e A2 e menos frequente no *pool* A3. Tendo em conta estes resultados, *mt85C* parece estar relacionado com casos de PPc com cargas parasitárias baixas a moderadas. Outro resultado importante foi revelado pela diferença significativa na distribuição de frequências de *mt85C* entre os *pools* E e F, que se traduz por uma maior frequência deste alelo nos casos com evolução clínica desfavorável. Ao contrário dos resultados obtidos na primeira fase da investigação, que apontavam para uma associação entre *mt85C* e os casos de pneumocistose com evolução favorável, a PCR *multiplex*/SBE realizada aos *pools* E e F, demonstrou que *mt85C* é mais comum entre os isolados de doentes com evolução clínica desfavorável. Estando tendencialmente ligado a casos com menores cargas parasitárias, e tendo em conta a hipótese de que baixos níveis de carga parasitária podem estar relacionados com evolução clínica desfavorável, pelo estabelecimento de uma infecção que se manifesta de forma mais insidiosa, e por isso, mais difícil de diagnosticar e de acompanhar, *mt85C* poderá estar associado a esses casos de infecção por *P. jirovecii*, podendo funcionar como um marcador molecular. No entanto, sugere-se que se realizem novos estudos, considerando *pools* provenientes de diversas regiões geográficas e com um maior número de isolados, para que se possam confirmar estes resultados. Adicionalmente, foi observado que a frequência de *mt85C*, nos vários *pools*, foi menor do que a esperada, pois, este alelo foi o mais frequente na primeira fase do trabalho, onde se estudaram isolados individuais por PCR, seguido de sequenciação directa. Esta diferença pode ter sido provocada por factores inerentes à técnica de SBE, que podem ter causado uma diminuição no sinal do fluorocrómo D2, correspondente à citosina (ddCTP-D2), por exemplo, por eventual degradação do fluorocrómo na mistura de reacção, ou, também pode ter sido causada pelo facto de se tratarem de diferentes amostragens, que apesar de terem sido seleccionadas de forma aleatória, podem, eventualmente, ter diferentes características entre os seus isolados. No entanto, esta eventual diminuição de sinal não influencia os resultados de comparação da distribuição

de frequências entre os diversos *pools*, pois repercute-se de modo proporcional nas várias reacções de SBE, o que valida os resultados obtidos no estudo dos *pools*.

No que diz respeito ao alelo *mt85A*, os resultados permitiram confirmar que este se encontra associado a casos de PPc com cargas parasitárias moderadas a elevadas, pois *mt85A* foi significativamente mais frequente nos *pools* A2 e A3 e menos comum no *pool* A1. Por outro lado, também se verificou uma diferença, estatisticamente significativa, na distribuição de frequências de *mt85A* entre os *pools* E e F. Este alelo foi claramente mais frequente no *pool* composto por isolados de casos com evolução clínica favorável, e menos frequente no *pool* com isolados de casos que apresentaram evolução clínica desfavorável. Apesar de estar associado a cargas parasitárias moderadas a elevadas, *mt85A* demonstra ser bastante frequente entre os casos de PPc com evolução clínica favorável. Esta característica pode ser causada pelo facto de *mt85A* integrar um haplótipo de organismos de *P. jirovecii* que, durante a infecção, se multiplicam rapidamente, mas que não oferecem um grau de severidade elevado, produzindo uma evolução clínica favorável, e/ou, pelo facto de, ao estarem correlacionados com cargas parasitárias mais elevadas, os organismos com *mt85A* poderem estabelecer rapidamente uma infecção sintomática, com parâmetros clínicos compatíveis e característicos de pneumocistose (ex. sintomas, tais como, tosse não produtiva, febre e dispneia, radiograma do tórax com infiltrado intersticial bilateral e PaO<sub>2</sub> no sangue periférico inferior a 65 mmHg), e por isso, mais fácil de diagnosticar e de acompanhar. Deste modo, *mt85A* poderá, eventualmente, estar associado a esses casos de infecção por *P. jirovecii*, podendo funcionar como um potencial marcador molecular. Novamente, sugere-se que se realizem novos estudos, considerando *pools* provenientes de diversas regiões geográficas e com um maior número de isolados, para que se possa confirmar esta associação.

O alelo *mt85T* foi significativamente mais frequente nos *pools* A1 e A3, ou seja, nos subgrupos de doentes com PPc com cargas parasitárias baixas ou elevadas, e menos comum no *pool* A2, composta por isolados de doentes com cargas parasitárias moderadas. A aplicação da PCR *multiplex*/SBE realizada aos *pools* E e F revelou uma diferença, estatisticamente significativa, na distribuição de frequências de *mt85T*, correspondente a uma maior frequência deste alelo nos casos de pneumocistose com evolução clínica desfavorável. Esta relação entre *mt85T* e evolução clínica desfavorável

pode ser causada pelo facto de *mt85T* poder integrar um haplótipo de organismos de *P. jirovecii* que, independentemente da carga parasitária, estabelece uma infecção com maior grau de severidade, contribuindo para uma evolução clínica menos favorável do doente. Foi já demonstrado que a variação de nucleótidos pode influenciar a estrutura secundária do rRNA, implicando alterações na conformação do ribossoma e na sua actividade, influenciando o fenómeno de transcrição [Noller 1984]. Os resultados da PCR *multiplex*/SBE efectuado aos *pools* de DNA de *P. jirovecii* revelaram que a natureza do nucleótido da base 85 do gene *mtLSU rRNA* pode funcionar como um potencial marcador molecular nos casos de PPc, confirmando a importância deste SNP.

**3) *SOD110* e *SOD215*:** No que se refere ao SNP *SOD110*, verificaram-se diferenças, estatisticamente significativas, na distribuição das frequências de *SOD110T* e *SOD110C*, entre os *pools* compostos por isolados de *P. jirovecii* com diferentes cargas parasitárias. Assim, *SOD110T* foi significativamente mais comum nos *pools* A1 e A2, enquanto *SOD110C* foi significativamente mais frequente no *pool* A3. Se por um lado *SOD110T* poderá estar correlacionado com casos de PPc com cargas parasitárias baixas a moderadas, por outro, *SOD110C* parece estar associado a casos com cargas parasitárias elevadas. De modo semelhante, também se observaram diferenças, estatisticamente significativas, na distribuição das frequências do SNP *SOD215* (*SOD215C* e *SOD215T*) entre os *pools* preparados com isolados de *P. jirovecii* com diferentes cargas parasitárias. Enquanto *SOD215C* foi significativamente mais frequente nos *pools* A1 e A2, *SOD215T* foi significativamente mais comum no *pool* A3. Estes resultados demonstram que *SOD215C* está associado a cargas parasitárias baixas a moderadas e que *SOD215T* está correlacionado com cargas parasitárias elevadas. Para nenhum dos SNPs do gene *SOD*, analisados por PCR *multiplex*/SBE, foram detectadas diferenças significativas, no que se refere à distribuição das frequências nos *pools* E e F, o que indica que, eventualmente, estes SNPs não têm qualquer impacto em factores intrínsecos do microrganismo, que influenciam a evolução clínica do doente.

Os resultados demonstraram que *SOD215C* e *SOD110T* podem estar, de algum modo, associados a organismos de *P. jirovecii* que se replicam a uma taxa relativamente baixa, e que por isso, estabelecem, com mais frequência, infecções com cargas parasitárias baixas a moderadas. Inversamente, os resultados obtidos para *SOD215T* e

*SOD110C* permitem considerar que estes podem estar associados a organismos de *P. jirovecii* com elevada capacidade de replicação, que, tendencialmente, estabelecem infecções com cargas parasitárias elevadas. Estas associações podem ser causadas pelo facto destes SNPs integrarem haplótipos de *P. jirovecii* com propriedades distintas, o que se pode traduzir, por exemplo, pela diferente capacidade de replicação dos organismos de cada haplótipo, durante a infecção. Toda esta informação vem ao encontro dos resultados obtidos durante a primeira fase da investigação, onde a caracterização genética de isolados individuais de *P. jirovecii*, permitiu determinar que, por um lado, *SOD215C* e *SOD110T* se encontravam estatisticamente associados e que ambos estavam, tendencialmente, correlacionados com casos de PPc com cargas parasitárias baixas, e que, por outro lado, *SOD215T* e *SOD110C*, também se encontravam estatisticamente associados e que ambos estavam, tendencialmente, correlacionados com casos de PPc com cargas parasitárias elevadas. A juntar a estas observações, acresce o facto dos SNPs *SOD215* e *SOD110* se encontrarem em desequilíbrio de ligação, o que também sugere a existência de genótipos de *P. jirovecii*, compostos pelas combinações de SNPs *SOD215C/SOD110T* e *SOD215T/SOD110C*, reforçando a hipótese da existência de haplótipos distintos deste microrganismo.

Relevância da aplicação das técnicas de PCR *multiplex*/SBE e de DNA *pooling* para o prognóstico da PPc. Os resultados relativos à técnica de PCR *multiplex*/SBE aplicada aos diferentes *pools* de DNA de *P. jirovecii*, permitiram observar que a análise da distribuição de frequências dos SNPs *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110* nos subgrupos de doentes seropositivos para VIH, com PPc confirmada laboratorialmente, com quadro clínico compatível, e com diferentes cargas parasitárias (baixa *pool* A1, moderada *pool* A2 e elevada *pool* A3), foi mais informativa, do que a análise da distribuição de frequências desses SNPs nos subgrupos de doentes seropositivos para VIH, com casos de PPc que apresentaram diferente evolução clínica (favorável *pool* E e desfavorável *pool* F). Contudo, o presente estudo, ao determinar as frequências relativas de cada SNP, nos respectivos *pools*, permitiu estabelecer a importância desses SNPs na infecção por *P. jirovecii*, tendo em conta os diferentes parâmetros em análise (carga parasitária e evolução clínica). A utilização de tecnologia como a PCR *multiplex*/SBE e o DNA *pooling*, permitiu conferir a importância de múltiplos SNPs,

associados a características clínicas específicas da infecção por *P. jirovecii*, durante a primeira fase do estudo, onde se caracterizaram isolados individuais de *P. jirovecii* por PCR, seguida de sequenciação directa. Esta abordagem, recorrendo a metodologias de alto rendimento, com monitorização dinâmica do procedimento experimental, permitiu a identificação de polimorfismos presentes nos diferentes grupos em estudo, possibilitando a exclusão de SNPs, aparentemente não relevantes (ex. *DHFR312*), e, conseguindo, classificar e relacionar, outros SNPs, com diferentes níveis de carga parasitária, e/ou, com graus de maior gravidade da doença (ex. *mt85*, *SOD215* e *SOD110*). Os resultados obtidos, permitem colocar a hipótese de que haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas podem existir, e que, regiões genéticas específicas, podem funcionar como marcadores desses mesmos organismos. Por exemplo, um isolado de *P. jirovecii* que apresente o MLG *mt85C/SOD215C/SOD110T*, tem uma forte probabilidade de estar associado a uma infecção com carga parasitária baixa a moderada. Por outro lado, quando se identifica o MLG *SOD215T/SOD110C* num isolado de *P. jirovecii*, existe uma forte probabilidade de se estar perante uma infecção com carga parasitária elevada. Saber a carga parasitária de *P. jirovecii* numa infecção pode revelar-se importante, pois, este parâmetro pode estar relacionado com a gravidade da infecção. Porém, deve de ser tido em conta o fenómeno de co-infecção, com mais do que um subtipo de *P. jirovecii*, um factor, que poderá ser importante na dinâmica da pneumocistose, e que pode ser analisado pela técnica de SBE. Esta metodologia permite facilmente determinar as frequências alélicas relativas dos SNPs, identificando e quantificando o fenómeno de infecções mistas que podem ocorrer numa infecção por *P. jirovecii*.

Nos últimos anos, diversas técnicas para análise de SNPs têm vindo a ser desenvolvidas e optimizadas, assentando essencialmente em métodos relativamente rápidos e automatizáveis, como é o caso da SBE. Esta técnica de análise de sequências genéticas permite a identificação de locais polimórficos conhecidos, tendo sido aplicada com êxito em inúmeros estudos moleculares [Vreeland *et al.* 2002; Lindroos *et al.* 2003; Kim & Misra 2007]. Ao comparar dois protocolos de alta sensibilidade e especificidade, o presente trabalho, aplicou pela primeira vez a tecnologia de SBE ao estudo de isolados de *P. jirovecii*, demonstrando a vantagem da sua utilização, na análise da diversidade genética deste microrganismo infeccioso. A SBE demonstrou ser uma técnica precisa,

consistindo num método robusto e compatível com processos de monitorização, tendo especial interesse, quando se pretende analisar vários genes em simultâneo, numa abordagem em *multiplex*.

Diversos foram os estudos que demonstraram que a técnica de PCR é mais sensível do que as técnicas de coloração, normalmente aplicadas para o diagnóstico da PPc [Wakefield *et al.* 1990b; Torres *et al.* 2000]. Recentemente, o desenvolvimento de metodologias de RT-PCR, permitiu demonstrar que a sensibilidade desta técnica pode fornecer informação adicional às técnicas microscópicas de diagnóstico convencional, e mesmo, aos resultados da PCR clássica, permitindo, para além de uma elevada sensibilidade, uma quantificação exacta do número de cópias de genes de *P. jirovecii*, seleccionados como alvo, presentes numa determinada amostra biológica. Protocolos de RT-PCR direccionados para genes de *P. jirovecii* foram desenvolvidos com sucesso, podendo funcionar como técnicas complementares do diagnóstico da PPc. Estudos demonstraram que a RT-PCR é mais sensível do que as técnicas convencionais de coloração, pois, ao permitir a detecção molecular directa de *P. jirovecii* em espécimes pulmonares, a metodologia de RT-PCR, elimina o passo, um tanto ou quanto subjectivo, de interpretação do operador, característico das técnicas microscópicas de diagnóstico [Arcenas *et al.* 2006; Rohner *et al.* 2009].

No entanto, permanece por esclarecer o significado clínico dos espécimes negativos para *P. jirovecii* pela análise microscópica, mas positivos pela técnica de RT-PCR, bem como, a relação entre as diferentes quantidades de organismos que podem ser detectadas em diferentes isolados de *P. jirovecii* e a severidade da infecção e evolução clínica dos doentes. Se por um lado, factores intrínsecos do hospedeiro podem ter impacto no desenrolar da infecção, por outro, factores genéticos de *P. jirovecii*, estão, muito provavelmente, implicados no estabelecimento e na evolução da pneumocistose [Helweg-Larsen *et al.* 1999; Barry & Johnson 2001; Hauser *et al.* 2001b; Matos *et al.* 2003b; Crothers *et al.* 2005; Walzer *et al.* 2008; Esteves *et al.* 2010a].

No decorrer do presente estudo foi desenvolvida uma nova metodologia de quantificação de DNA de *P. jirovecii*, tendo por base um protocolo de RT-PCR descrito por Rohner *et al.* 2009. Este novo protocolo de RT-PCR, direccionado para o gene *KEX1* de *P. jirovecii*, teve por princípio uma curva de calibração, optimizada e

calculada com base numa amostra padrão do gene *KEX1*, tendo sido aplicado na quantificação de DNA de *P. jirovecii* para a preparação de *pools*. Deste modo, um protocolo de preparação de *pools* de DNA foi aplicado pela primeira vez ao estudo de *P. jirovecii*, demonstrando ser uma inovadora técnica para a determinação da importância de SNPs específicos, tendo em conta as suas frequências em subgrupos de isolados com características clínicas distintas.

A associação das técnicas de PCR *multiplex*/SBE e de DNA *pooling*, aplicada pela primeira vez no estudo de isolados de *P. jirovecii*, demonstrou ser uma metodologia robusta e específica para o estudo de SNPs, caracterizando-se por uma abordagem de alto rendimento, com monitorização dinâmica do procedimento experimental, a qual permitiu a identificação e classificação de múltiplos SNPs relacionados com diferentes parâmetros clínicos. Com esta informação, pretende-se que a PCR *multiplex*/SBE possa servir como uma técnica utilizada para o prognóstico da infecção por *P. jirovecii*. Ao permitir, de uma forma rápida, sensível e específica a identificação de múltiplos SNPs de *P. jirovecii*, relacionados com diferentes graus de severidade da doença, esta técnica pode ser aplicada no rastreio de amostras de secreções pulmonares, obtidas de doentes com suspeita de pneumocistose, podendo-se desde logo, disponibilizar informação acerca do isolado, e se este apresenta genótipos relacionados com alguma característica específica da infecção. Com esta abordagem pretende-se que o clínico possa obter informação prévia sobre os organismos de *P. jirovecii* que infectam um determinado doente, podendo esta informação auxiliar as suas decisões.

Outros estudos deverão ser realizados, considerando *pools* provenientes de diversas regiões geográficas e com um maior número de isolados, bem como *pools* constituídos por isolados com outras características clínicas, englobando para além das cargas parasitárias e da evolução clínica dos doentes, parâmetros, tais como, diagnóstico clínico, contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, profilaxia, terapêutica, e dados demográficos como a idade dos doentes. Desta forma, poder-se-á estabelecer em definitivo, associações entre características genéticas específicas do patógeno e os parâmetros da infecção, de modo a que técnicas precisas de identificação de SNPs relevantes de *P. jirovecii*, tais como a PCR *multiplex*/SBE, possam ser utilizadas como metodologias



complementares de apoio na identificação e caracterização dos casos de PPc, auxiliando as decisões clínicas.

## 13. Discussão geral e perspectivas futuras

### 13.1. Discussão geral

*P. jirovecii* é reconhecido como uma importante causa de pneumonia em doentes imunocomprometidos, com especial relevância no grupo de doentes seropositivos para VIH. Diversos estudos moleculares demonstraram que sequências polimórficas de DNA são frequentemente detectadas em isolados de *P. jirovecii*, sugerindo que a variação genética é comum neste microrganismo e que diversos subtipos genéticos podem existir [Lee *et al.* 1993; Lu *et al.* 1994; Wakefield 1998; Hauser *et al.* 1998; Morris *et al.* 2004; Beck & Cushion 2009; Esteves *et al.* 2010a; Esteves *et al.* 2010b; Matos & Esteves 2010b]. Até ao momento, as tentativas de associar genótipos específicos deste agente patogénico oportunista com a informação clínica, ou com parâmetros da infecção, têm sido inconclusivas. As razões pelas quais alguns doentes sofrem de graus moderados de PPc, com resposta favorável aos regimes terapêuticos instituídos, enquanto outros sofrem de PPc severa, que pode ser fatal, apesar da terapia, bem como, as razões que levam ao estabelecimento de infecções com diferentes cargas parasitárias, não estão completamente esclarecidas. Alguns estudos apontam para que diversos indicadores do prognóstico clínico possam estar relacionados com a apresentação e a evolução da infecção por *P. jirovecii*. Outros estudos demonstraram que polimorfismos específicos podem determinar características epidemiológicas do microrganismo, como a genética da população, a distribuição geográfica de determinados subtipos, os modos de transmissão, ou mesmo, fenómenos de resistência a fármacos, ou diferentes graus de virulência [Miller & Wakefield 1999; Beard *et al.* 2000; Barry & Johnson 2001; Hauser *et al.* 2001b; Crothers *et al.* 2005; Costa *et al.* 2006b; Miller *et al.* 2007; Radhi *et al.* 2008; Walzer *et al.* 2008; Esteves *et al.* 2010a; Matos & Esteves 2010a; Esteves *et al.* 2010b; Matos & Esteves 2010b]. Tendo por base estes dados, coloca-se a hipótese de que a virulência de um determinado subtipo de *P. jirovecii* possa estar dependente de múltiplos genótipos e, portanto, da associação de polimorfismos múltiplos que ocorrem em diversas regiões do genoma.

Com o objectivo de identificar genes associados com factores da infecção por *P. jirovecii*, efectuou-se o estudo da variabilidade genética de isolados deste microrganismo, em Portugal. O trabalho envolveu a recolha de espécimes pulmonares de doentes infectados por *P. jirovecii* com diferentes características clínicas (doentes

com co-infecção VIH/*P. jirovecii*, com e sem quadro clínico compatível com PPc, e doentes seronegativos para VIH, infectados por *P. jirovecii*), e integrou as metodologias de IFI/AcM, PCR, PCR seguido de sequenciação directa, PCR seguido de RFLP, RT-PCR, PCR *multiplex* seguido de SBE e DNA *pooling*.

Na primeira fase da investigação efectuou-se uma pesquisa bibliográfica com o intuito de avaliar o potencial interesse de genes de *P. jirovecii*. Os genes *mtLSU rRNA*, *CYB*, *SOD*,  $\beta$  *TUB*, *TRR1*, *TS*, *DHFR*, *DHPS*, região *UCS* das MSGs e *KEX1*, foram seleccionados com base nas fontes bibliográficas, das quais foi possível obter informação acerca das características e variabilidade das sequências, a sua importância a nível metabólico, e a eventual associação entre estas regiões e parâmetros da infecção, tais como fenómenos de resistência a fármacos, factores de virulência, propriedades de superfície do microrganismo e diferentes graus de severidade da infecção. Nesta primeira fase, a diversidade genética, as frequências de distribuição de SNPs e a relação entre os genótipos observados e diversos parâmetros da infecção, foram investigadas, aplicando as técnicas de PCR, sequenciação directa e RFLP. Assim, para os polimorfismos seleccionados, procedeu-se a uma análise individual das amostras, com o objectivo de encontrar diferenças significativas entre os diversos subgrupos em análise (ex. casos com cargas parasitárias elevadas *versus* casos com cargas parasitárias baixas, ou casos com evolução clínica favorável *versus* casos com evolução clínica desfavorável). Nesta fase da investigação, os 10 *loci* de *P. jirovecii*, seleccionados como genes de interesse, foram caracterizados, detectando-se um total de 23 SNPs. Foram identificados quatro SNPs potencialmente relacionados com parâmetros clínicos da infecção, e, por isso, considerados como relevantes (*mt85*, *SOD110*, *SOD215* e *DHFR312*). Foi observado que um genótipo específico (*SOD110C/SOD215T*) se encontrava associado a casos de PPc com maior severidade, enquanto que outros dois genótipos (*mt85C/SOD215C* e *SOD110T/SOD215C*) se encontravam associados a casos de PPc com menor severidade. Adicionalmente, os resultados permitiram confirmar o declínio das mutações do gene *DHPS*, associadas a casos de insucesso da profilaxia anti-*P. jirovecii* com fármacos da família das sulfas, declínio esse, que pode ter sido causado pelo decréscimo no uso destes fármacos, após a introdução da HAART, em Portugal. A análise cruzada das sequências permitiu detectar correlações entre SNPs, sugerindo a existência de potenciais haplótipos de *P. jirovecii*. O teste recombinatório d1 foi aplicado para estudar desvios à distribuição panmítica, na população de *P. jirovecii*, tendo sido calculado com os resultados combinados da genotipagem de

quatro genes nucleares (*SOD*,  $\beta$  *TUB*, *DHFR* e *DHPS*), que funcionaram como marcadores genéticos, e que permitiram a identificação de 14 MLGs de *P. jirovecii*, cujas frequências variaram entre 3 e 30%. Os resultados do teste d1 sugerem elevada recombinação entre a maioria dos MLGs de *P. jirovecii*. Porém, verificou-se que o MLG E se encontra sobre-representado na população e, provavelmente, sob propagação clonal e em desequilíbrio de ligação, indicando que, muito provavelmente, *P. jirovecii* é representado por uma população com estrutura epidémica, caracterizada por recombinação genética frequente, mas, na qual, ocasionalmente, um clone bem sucedido, tende, rapidamente, a aumentar a sua frequência originando um clone epidémico.

Na segunda fase da investigação, desenvolveram-se e implementaram-se metodologias de elevada capacidade (PCR *multiplex*/SBE em associação com DNA *pooling*) para haplotipagem de *P. jirovecii* em amostras clínicas. A aplicação destas metodologias teve como objectivo acelerar a identificação dos SNPs de *P. jirovecii* com impacto a nível clínico, permitindo uma aproximação baseada em haplótipos para a caracterização deste microrganismo patogénico. A optimização da metodologia de *pooling* seguida de PCR *multiplex*/SBE assentou em diversos passos, como a selecção e validação da técnica de quantificação de DNA, a preparação dos *pools* de DNA de *P. jirovecii*, a determinação das frequências dos SNPs nos respectivos *pools* por PCR *multiplex*/SBE, e o estudo da correlação entre os SNPs e os parâmetros clínicos da PPc. O sucesso desta abordagem demonstrou ser dependente de diversos factores, incluindo as temperaturas de hibridação dos *primers*, que devem ser semelhantes entre si, a formação de estruturas secundárias e a complementaridade entre oligonucleótidos (ex. *primers*), que devem ser minimizadas, e ainda, as concentrações dos diversos reagentes nas misturas de reacção, que devem ser optimizadas. Por outro lado, na preparação e composição dos *pools* deve ser utilizada uma técnica de quantificação de DNA exacta e precisa, tendo sido adaptado e desenvolvido um modelo experimental baseado numa reacção de RT-PCR específica, para quantificação de DNA de *P. jirovecii*. Assim, foram criados *pools* compostos por isolados de doentes com PPc com diferentes parâmetros clínicos (ex. casos de PPc com diferentes cargas parasitárias, ou casos de PPc com evolução clínica distinta). A distribuição das frequências dos SNPs nos diferentes *pools* foi investigada. A técnica de PCR *multiplex*/SBE foi aplicada com sucesso na identificação de polimorfismos genéticos de *P. jirovecii* em *pools* de DNA, demonstrando que é possível o estudo de SNPs de *P. jirovecii* num formato

múltiplo, abrangendo um elevado número de amostras. Esta metodologia foi desenvolvida utilizando como modelo os SNPs *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110*, que demonstraram ser regiões variáveis, associadas, durante a primeira fase do estudo, a parâmetros clínicos da infecção.

O presente estudo, o primeiro a aplicar a técnica de PCR *multiplex*/SBE em *pools* de DNA de *P. jirovecii*, permitiu determinar a distribuição das frequências relativas dos SNPs *DHFR312*, *mt85*, *SOD215* e *SOD110* em subgrupos de doentes, com diferentes características clínicas. Os *pools* analisadas com sucesso pela técnica de PCR *multiplex*/SBE consistiram em isolados de doentes seropositivos para VIH, com PPc confirmada laboratorialmente, com quadro clínico compatível, e com diferentes cargas parasitárias (baixa *pool* A1, moderada *pool* A2 e elevada *pool* A3), e em isolados de doentes seropositivos para VIH, com casos de PPc que apresentaram diferente evolução clínica (favorável *pool* E e desfavorável *pool* F). Esta abordagem, permitiu a identificação de polimorfismos presentes nos diferentes grupos em estudo, possibilitando a exclusão de SNPs, aparentemente não relevantes (ex. *DHFR312*), e, conseguindo, classificar e relacionar, outros SNPs, com diferentes níveis de carga parasitária, e/ou, com graus de maior gravidade da doença (ex. *mt85*, *SOD215* e *SOD110*). Os diferentes SNPs identificados podem, de alguma forma, estar associados a haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas, ou seja, potencialmente implicados em diferentes graus de severidade da doença.

Os resultados obtidos, permitem colocar a hipótese de que haplótipos de *P. jirovecii* com características distintas podem existir, e que, regiões genéticas específicas, podem funcionar como marcadores desses mesmos organismos. Foi identificado um MLG (*mt85C/SOD215C/SOD110T*) que, aparentemente, se encontra associado a infecções de *P. jirovecii* com cargas parasitárias baixas a moderadas. Este MLG pode ser parte integrante de um haplótipo de *P. jirovecii* associado a organismos que se replicam a uma taxa relativamente baixa, e que, por isso, estabelecem, com maior frequência, infecções com cargas parasitárias baixas a moderadas. Por outro lado, foi identificado um MLG (*SOD215T/SOD110C*) que parece estar associado a infecções de *P. jirovecii* com cargas parasitárias elevadas. Este MLG pode fazer parte de um haplótipo de organismos de *P. jirovecii* que, durante a infecção, se replicam rapidamente, estabelecendo, com maior frequência, uma infecção aguda, caracterizada pela detecção de cargas parasitárias mais elevadas. Estas diferenças podem ser causadas pelo facto destes MLGs integrarem haplótipos de *P. jirovecii* com

propriedades distintas, o que se pode traduzir, por exemplo, pela diferente capacidade de replicação dos organismos de cada haplótipo, durante a infecção.

A robustez e a versatilidade da metodologia proposta demonstrou que a sua aplicação em estudos de genotipagem de *P. jirovecii*, onde se pretendem relacionar parâmetros clínicos da PPc com informação genética dos isolados, pode ser uma opção válida com elevada sensibilidade, reprodutibilidade e fidelidade. Com base nestes resultados, conclui-se que a PCR *multiplex*/SBE pode ser uma ferramenta importante na caracterização do perfil genético de *P. jirovecii*, possibilitando a amplificação e caracterização de diversos fragmentos, de uma forma rápida, e permitindo, por um lado, o uso em larga escala (ex. *pools* de DNA), com genotipagem eficiente de um elevado número de amostras, e por outro, o aumento do rendimento de operação, obviando os custos inerentes. Com haplótipos devidamente identificados, os quais poderão estar implicados com determinados parâmetros clínicos da infecção por *P. jirovecii*, pretende-se que, em futuros trabalhos, se confirmem estes resultados, de modo a aplicar o conhecimento gerado, no auxílio ao diagnóstico e à escolha adequada do tratamento da infecção por *P. jirovecii*.

### 13.2. Perspectivas futuras

De futuro, novas investigações deverão ser realizadas, considerando *pools* de DNA de *P. jirovecii* constituídos por isolados que englobem, para além de diferentes cargas parasitárias e evolução clínica dos doentes, outros parâmetros da infecção, como o diagnóstico clínico, a contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, a profilaxia, a terapêutica, bem como dados demográficos, como a idade dos doentes. Com o objectivo de validar as associações estabelecidas entre os subgrupos de doentes e as características genéticas dos organismos de *P. jirovecii*, esses *pools* deverão conter um maior número de isolados, os quais deverão ser obtidos em diferentes regiões geográficas. Propõe-se assim, a realização de um estudo multicêntrico, onde, a metodologia utilizada no presente estudo, seja aplicada em *pools* de amostras obtidas em vários pontos do globo, de modo a comparar resultados. Propõe-se também que outros genes de interesse sejam investigados, como os genes associados a casos de resistência a fármacos da família das sulfas, que poderão apresentar diferentes frequências nas diversas regiões geográficas a estudar, consequência da utilização diferenciada das sulfas nas diversas populações. Com este procedimento, pretendem-se estabelecer em definitivo, associações entre as características genéticas específicas do agente patogénico e os parâmetros da infecção,

de modo a que técnicas precisas de identificação de SNPs relevantes, tais como a PCR *multiplex*/SBE, possam ser utilizadas como metodologias complementares de diagnóstico da pneumocistose. A aplicação destas metodologias pode acelerar a identificação de polimorfismos de *P. jirovecii* relevantes a nível clínico, permitindo uma aproximação baseada em haplótipos para caracterização clínica deste microrganismo patogénico, auxiliando e adequando a escolha do tratamento mais indicado, e por isso permitindo um melhor controlo da doença.

Para além da elevada versatilidade, robustez e sensibilidade, demonstrada pelas técnicas de PCR *multiplex*/SBE e de DNA *pooling*, a monitorização dinâmica que proporcionam durante o processo experimental, fazem com que sejam indicadas, não só para o estudo de *P. jirovecii*, mas também para o estudo de inúmeros microrganismos, em especial de microrganismos não cultiváveis, nos quais, a limitação da amostra, faz com que sejam requeridas técnicas de alta capacidade, para que seja possível a caracterização adequada de isolados, tal como ficou demonstrado, no presente estudo, para o caso de *P. jirovecii*.

## 14. Referências bibliográficas

- Abderrazak, S. B., Oury, B., Lal, A. A., Bosseno, M. F., Force-Barge, P., Dujardin, J. P., Fandeur, T., Molez, J. F., Kjellberg, F., Ayala, F. J. & Tibayrenc, M. (1999). *Plasmodium falciparum*: population genetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and other molecular markers. *Exp.Parasitol.*, 92: 232-238.
- Al-Tawfiq, J. A., Sorensen, S. J. & Cushing, H. E. (1999). Therapeutic failure of trimethoprim/sulfamethoxazole in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Ann.Pharmacother.*, 33: 413-415.
- Alibrahim, A., Lepore, M., Lierl, M., Filipovich, A. & Assaad, A. (1998). *Pneumocystis carinii* pneumonia in an infant with X-linked agammaglobulinemia. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 101: 552-553.
- Aliouat, E. M., Mazars, E., Dei-Cas, E., Delcourt, P., Billaut, P. & Camus, D. (1994). *Pneumocystis cross* infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 71S.
- Aliouat-Denis, C. M., Chabe, M., Demanche, C., Aliouat, e. M., Viscogliosi, E., Guillot, J., Delhaes, L. & Dei-Cas, E. (2008). *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infect.Genet.Evol.*, 8: 708-726.
- Allegra, C. J., Kovacs, J. A., Drake, J. C., Swan, J. C., Chabner, B. A. & Masur, H. (1987). Activity of antifolates against *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase and identification of a potent new agent. *J.Exp.Med.*, 165: 926-931.
- Alvarez-Martinez, M. J., Miro, J. M., Valls, M. E., Moreno, A., Rivas, P. V., Sole, M., Benito, N., Domingo, P., Munoz, C., Rivera, E., Zar, H. J., Wissmann, G., Diehl, A. R., Prolla, J. C., de Anta, M. T., Gatell, J. M., Wilson, P. E. & Meshnick, S. R. (2006). Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 56: 153-160.
- Alvarez-Martinez, M. J., Moreno, A., Miro, J. M., Valls, M. E., Rivas, P. V., de, L. E., Sued, O., Benito, N., Domingo, P., Ribera, E., Santin, M., Sirera, G., Segura, F., Vidal, F., Rodriguez, F., Riera, M., Cordero, M. E., Arribas, J. R., Jimenez de Anta, M. T., Gatell, J. M., Wilson, P. E. & Meshnick, S. R. (2008). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Spanish HIV-infected patients in the combined antiretroviral therapy era: prevalence of dihydropteroate synthase mutations and prognostic factors of mortality. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 62: 34-43.
- Alves, M., Matos, O. & Antunes, F. (2001). Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Ann.Trop.Med.Parasitol.*, 95: 627-632.
- Amsden, G. W., Kowalsky, S. F. & Morse, G. D. (1992). Trimetrexate for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *Ann.Pharmacother.*, 26: 218-226.



Anderson, A. C., Perry, K. M., Freymann, D. M. & Stroud, R. M. (2000). The crystal structure of thymidylate synthase from *Pneumocystis carinii* reveals a fungal insert important for drug design. *J.Mol.Biol.*, 297: 645-657.

Antinori, A., Murri, R., Ammassari, A., De, L. A., Linzalone, A., Cingolani, A., Damiano, F., Maiuro, G., Vecchiet, J. & Scoppettuolo, G. (1995). Aerosolized pentamidine, cotrimoxazole and dapsone-pyrimethamine for primary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasmic encephalitis. *AIDS*, 9: 1343-1350.

Arcenas, R. C., Uhl, J. R., Buckwalter, S. P., Limper, A. H., Crino, D., Roberts, G. D. & Wengenack, N. L. (2006). A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 54: 169-175.

Armstrong, W., Meshnick, S. & Kazanjian, P. (2000). *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes.Infect.*, 2: 61-67.

Arner, E. S. & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur.J.Biochem.*, 267: 6102-6109.

Atzori, C., Angeli, E., Agostoni, F., Mainini, A., Micheli, V. & Cargnel, A. (1998). Biomolecular techniques to detect *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Int.J.Infect.Dis.*, 3: 76-81.

Atzori, C., Lu, J. J., Jiang, B., Bartlett, M. S., Orlando, G., Queener, S. F., Smith, J. W., Cargnel, A. & Lee, C. H. (1995). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reactions on serum specimens. *J.Infect.Dis.*, 172: 1623-1626.

Azoulay, E., Parrot, A., Flahault, A., Cesari, D., Lecomte, I., Roux, P., Saidi, F., Fartoukh, M., Bernaudin, J. F., Cadranet, J. & Mayaud, C. (1999). AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia in the era of adjunctive steroids: implication of BAL neutrophilia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 160: 493-499.

Banerji, S., Lugli, E. B., Miller, R. F. & Wakefield, A. E. (1995). Analysis of genetic diversity at the *aroA* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 42: 675-679.

Barry, S. M. & Johnson, M. A. (2001). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV.Med.*, 2: 123-132.

Bartlett, M. S., Angus, W. C., Shaw, M. M., Durant, P. J., Lee, C. H., Pascale, J. M. & Smith, J. W. (1998). Antibody to *Pneumocystis carinii* protects rats and mice from developing pneumonia. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 5: 74-77.

Bartlett, M. S., Lu, J. J., Lee, C. H., Durant, P. J., Queener, S. F. & Smith, J. W. (1996). Types of *Pneumocystis carinii* detected in air samples. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 43: 44S.

- Bartlett, M. S., Vermund, S. H., Jacobs, R., Durant, P. J., Shaw, M. M., Smith, J. W., Tang, X., Lu, J. J., Li, B., Jin, S. & Lee, C. H. (1997). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 2511-2513.
- Baselski, V. S., Robison, M. K., Pifer, L. W. & Woods, D. R. (1990). Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using Cellufluor staining. *J.Clin.Microbiol.*, 28: 393-394.
- Bauer, N. L., Paulsrud, J. R., Bartlett, M. S., Smith, J. W. & Wilde, C. E., III (1993). *Pneumocystis carinii* organisms obtained from rats, ferrets, and mice are antigenically different. *Infect.Immun.*, 61: 1315-1319.
- Baughman, R. P. (1994). Current methods of diagnosis. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2<sup>a</sup> edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 381-401).
- Baughman, R. P., Strohofer, S. S., Clinton, B. A., Nickol, A. D. & Frame, P. T. (1989). The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 113: 1062-1065.
- Bava, A. J., Cattaneo, S. & Bellegarde, E. (2002). Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, 44: 279-282.
- Beard, C. B., Carter, J. L., Keely, S. P., Huang, L., Pieniazek, N. J., Moura, I. N., Roberts, J. M., Hightower, A. W., Bens, M. S., Freeman, A. R., Lee, S., Stringer, J. R., Duchin, J. S., Del, R. C., Rimland, D., Baughman, R. P., Levy, D. A., Dietz, V. J., Simon, P. & Navin, T. R. (2000). Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg.Infect.Dis.*, 6: 265-272.
- Beard, C. B., Jennings, V. M., Teague, W. G., Carter, J. L., Mabry, J., Moura, H., Visvesvara, G. S., Collins, W. E. & Navin, T. R. (1999). Experimental inoculation of immunosuppressed owl monkeys with *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 46: 113S-115S.
- Beard, C. B., Roux, P., Nevez, G., Hauser, P. M., Kovacs, J. A., Unnasch, T. R. & Lundgren, B. (2004). Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg.Infect.Dis.*, 10: 1729-1735.
- Beck, J. M. & Cushion, M. T. (2009). *Pneumocystis* workshop: 10th anniversary summary. *Eukaryot.Cell*, 8: 446-460.
- Beck, J. M., Newbury, R. L., Palmer, B. E., Warnock, M. L., Byrd, P. K. & Kaltreider, H. B. (1996). Role of CD8<sup>+</sup> lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J.Lab Clin.Med.*, 128: 477-487.
- Benfield, T. L., van Steenwijk, R., Nielsen, T. L., Dichter, J. R., Lipschik, G. Y., Jensen, B. N., Junge, J., Shelhamer, J. H. & Lundgren, J. D. (1995). Interleukin-8 and eicosanoid production in the lung during moderate to severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: a role of interleukin-8 in the pathogenesis of *P. carinii* pneumonia. *Respir.Med.*, 89: 285-290.

Benson, C. A., Kaplan, J. E., Masur, H., Pau, A. & Holmes, K. K. (2004). Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm. Rep.*, 53: 1-112.

Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-Van Dillen, P. M. & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J.Clin.Microbiol.*, 28: 495-503.

Bozzette, S. A., Finkelstein, D. M., Spector, S. A., Frame, P., Powderly, W. G., He, W., Phillips, L., Craven, D., van der Horts, C. & Feinberg, J. (1995). A randomized trial of three antipneumocystis agents in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. NIAID AIDS Clinical Trials Group. *N.Engl.J.Med.*, 332: 693-699.

Bozzette, S. A. & Morton, S. C. (1995). Reconsidering the use of adjunctive corticosteroids in *Pneumocystis* pneumonia? *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.Hum. Retrovirol.*, 8: 345-347.

Bozzette, S. A., Sattler, F. R., Chiu, J., Wu, A. W., Gluckstein, D., Kemper, C., Bartok, A., Niosi, J., Abramson, I., Coffman, J., *et al.* (1990). A controlled trial of early adjunctive treatment with corticosteroids for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. California Collaborative Treatment Group. *N.Engl.J.Med.*, 323: 1451-1457.

Brooks, K. R., Ong, R., Spector, R. S. & Greenbaum, D. M. (1993). Acute respiratory failure due to *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Crit Care Clin.*, 9: 31-48.

Campbell, W. G., Jr. (1972). Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lung. Life cycle in human pneumocystosis. *Arch.Pathol.*, 93: 312-324.

Cardenal, R., Medrano, F. J., Varela, J. M., Ordonez, A., Regordan, C., Rincon, M., Martinez, A. & Calderon, E. J. (2001). *Pneumocystis carinii* pneumonia in heart transplant recipients. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.*, 20: 799-802.

Casanova-Cardiel, L. & Leibowitz, M. J. (1997). Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 44: 28S.

Caumes, E., Roudier, C., Rogeaux, O., Bricaire, F. & Gentilini, M. (1994). Effect of corticosteroids on the incidence of adverse cutaneous reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole during treatment of AIDS-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin.Infect.Dis.*, 18: 319-323.

Cere, N., Drouet-Viard, F., Dei-Cas, E., Chanteloup, N. & Coudert, P. (1997). In utero transmission of *Pneumocystis carinii* sp. f. *oryctolagi*. *Parasite*, 4: 325-330.

Chabe, M., Dei-Cas, E., Creusy, C., Fleurisse, L., Respaldiza, N., Camus, D. & Durand-Joly, I. (2004). Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 23: 89-97.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaza humana. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, 1: 159-218.

Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. & Caskey, C. T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.*, 16: 11141-11156.

Chandra, P., Delaney, M. D. & Tuazon, C. U. (1988). Role of special stains in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection from bronchial washing specimens in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Acta Cytol.*, 32: 105-108.

Chary-Reddy, S. & Graves, D. C. (1996). Identification of extrapulmonary *Pneumocystis carinii* in immunocompromised rats by PCR. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 1660-1665.

Chen, W., Gigliotti, F. & Harmsen, A. G. (1993). Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 61: 5406-5409.

Chen, W., Havell, E. A., Moldawer, L. L., McIntyre, K. W., Chizzonite, R. A. & Harmsen, A. G. (1992). Interleukin 1: an important mediator of host resistance against *Pneumocystis carinii*. *J.Exp.Med.*, 176: 713-718.

Chusid, M. J. & Heyrman, K. A. (1978). An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia at a pediatric hospital. *Pediatrics*, 62: 1031-1035.

Cohen, O. J. & Stoeckle, M. Y. (1991). Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch.Intern.Med.*, 151: 1205-1214.

Conte, J. E., Jr. & Golden, J. A. (1988). Concentrations of aerosolized pentamidine in bronchoalveolar lavage, systemic absorption, and excretion. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 32: 1490-1493.

Costa, M. C. (2006). Estudo da resistência de *Pneumocystis jirovecii* ao cotrimoxazol em doentes com infecção VIH/SIDA. Tese de dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Costa, M. C., Esteves, F., Antunes, F. & Matos, O. (2006a). Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *J.Antimicrob.Chemother.*, 58: 1246-1249.

Costa, M. C., Esteves, F., Antunes, F. & Matos, O. (2006b). Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in immunocompromised patients: preliminary results. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 53 Suppl 1: S104-S105.

Costa, M. C., Gaspar, J., Mansinho, K., Esteves, F., Antunes, F. & Matos, O. (2005). Detection of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Scand.J.Infect.Dis.*, 37: 766-771.

Costa, M. C., Helweg-Larsen, J., Lundgren, B., Antunes, F. & Matos, O. (2003). Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 22: 516-520.

Crans, C. A., Jr. & Boisselle, P. M. (1999). Imaging features of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Crit Rev.Diagn.Imaging*, 40: 251-284.

Crothers, K., Beard, C. B., Turner, J., Groner, G., Fox, M., Morris, A., Eiser, S. & Huang, L. (2005). Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS*, 19: 801-805.

Cushion, M. T. (1994). Transmission and epidemiology. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 123-140).

Cushion, M. T. (2004). *Pneumocystis*: unraveling the cloak of obscurity. *Trends Microbiol.*, 12: 243-249.

Cushion, M. T. (1998). In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9ª edição, Volume 4. Collier L., Balows A., Sussman M. (Editores). New York: Arnold Publishing.

Cushion, M. T., Collins, M., Hazra, B. & Kaneshiro, E. S. (2000). Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44: 713-719.

Cushion, M. T., Kaselis, M., Stringer, S. L. & Stringer, J. R. (1993). Genetic stability and diversity of *Pneumocystis carinii* infecting rat colonies. *Infect.Immun.*, 61: 4801-4813.

Cushion, M. T., Linke, M. J., Collins, M., Keely, S. P. & Stringer, J. R. (1999). The minimum number of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* organisms required to establish infections is very low. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 46: 111S.

Daffertshofer, A., Lamoth, C. J., Meijer, O. G. & Beek, P. J. (2004). PCA in studying coordination and variability: a tutorial. *Clin.Biomech.(Bristol., Avon.)*, 19: 415-428.

Daniels, R., Volkman, S. K., Milner, D. A., Mahesh, N., Neafsey, D. E., Park, D. J., Rosen, D., Angelino, E., Sabeti, P. C., Wirth, D. F. & Wiegand, R. C. (2008). A general SNP-based molecular barcode for *Plasmodium falciparum* identification and tracking. *Malar.J.*, 7: 223.

de Meeûs T., McCoy, K. D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Bousses, S. & Renaud, F. (2007). Population genetics and molecular epidemiology or how to "debusquer la bete". *Infect.Genet.Evol.*, 7: 308-332.

de Souza W. & Benchimol, M. (2005). Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 100: 903-908.

De Stefano, J. A., Cushion, M. T., Puvanesarajah, V. & Walzer, P. D. (1990a). Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. II. Sugar composition. *J.Protozool.*, 37: 436-441.

De Stefano, J. A., Cushion, M. T., Sleight, R. G. & Walzer, P. D. (1990b). Analysis of *Pneumocystis carinii* cyst wall. I. Evidence for an outer surface membrane. *J.Protozool.*, 37: 428-435.

- DeFranco, A. L., Locksley, R. M. & Robertson, M. (2007). The immune response to fungal and parasitic infection. In: *Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease*, 1ª edição. Karen Freeland (Editor). New Science Press Ltd. (pp. 266-279).
- Dei-Cas, E. (2000). *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Med.Mycol.*, 38 Suppl 1: 23-32.
- Dei-Cas, E., Brun-Pascaud, M., Bille-Hansen, V., Allaert, A. & Aliouat, E. M. (1998). Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 22: 163-168.
- Delanoë, P. & Delanoë, M. (1912). Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *trypanosoma Lewisii*. *C.R.Acad.Sci.(Paris)*, 155: 658-660.
- Delmas, M. C., Schwoebel, V., Heisterkamp, S. H., Downs, A. M., ncelle-Park, R. A. & Brunet, J. B. (1995). Recent trends in *Pneumocystis carinii* pneumonia as AIDS-defining disease in nine European countries. Coordinators for AIDS Surveillance. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.Hum.Retrovirol.*, 9: 74-80.
- Denis, C. M., Guyot, K., Wakefield, A. E., Dive, D., Dei-Cas, E., Camus, D. & Odberg-Ferragut, C. (1998). Molecular cloning and characterization of a superoxide dismutase (sod) gene in *Pneumocystis carinii*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 45: 475-483.
- Denis, C. M., Mazars, E., Guyot, K., Odberg-Ferragut, C., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E. & Wakefield, A. E. (2000). Genetic divergence at the SODA locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. *Med.Mycol.*, 38: 289-300.
- Dohn, M. N., Baughman, R. P., Vigdorth, E. M. & Frame, D. L. (1992). Equal survival rates for first, second, and third episodes of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch.Intern.Med.*, 152: 2465-2470.
- Dohn, M. N. & Frame, P. T. (1994). Clinical manifestations in adults. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 331-359).
- Dohn, M. N., Weinberg, W. G., Torres, R. A., Follansbee, S. E., Caldwell, P. T., Scott, J. D., Gathe, J. C., Jr., Haghighat, D. P., Sampson, J. H., Spotkov, J., Deresinski, S. C., Meyer, R. D. & Lancaster, D. J. (1994). Oral atovaquone compared with intravenous pentamidine for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. Atovaquone Study Group. *Ann.Intern.Med.*, 121: 174-180.
- Dohn, M. N., White, M. L., Vigdorth, E. M., Ralph, B. C., Hertzberg, V. S., Baughman, R. P., George, S. A. & Walzer, P. D. (2000). Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 162: 1617-1621.
- Edelstein, H. & McCabe, R. E. (1990). Atypical presentations of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients receiving inhaled pentamidine prophylaxis. *Chest*, 98: 1366-1369.

- Edlind, T. D., Bartlett, M. S., Weinberg, G. A., Prah, G. N. & Smith, J. W. (1992). The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. *Mol.Microbiol.*, 6: 3365-3373.
- Edman, J. C., Edman, U., Cao, M., Lundgren, B., Kovacs, J. A. & Santi, D. V. (1989a). Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86: 8625-8629.
- Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., Santi, D. V., Elwood, H. J. & Sogin, M. L. (1988). Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334: 519-522.
- Edman, J. C. & Sogin, M. L. (1994). Molecular Phylogeny of *Pneumocystis carinii*. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 91-105).
- Edman, U., Edman, J. C., Lundgren, B. & Santi, D. V. (1989b). Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86: 6503-6507.
- Edwards, M. C. & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl.*, 3: S65-S75.
- El-Sadr, W. M., Murphy, R. L., Yurik, T. M., Luskin-Hawk, R., Cheung, T. W., Balfour, H. H., Jr., Eng, R., Hooton, T. M., Kerkering, T. M., Schutz, M., van der Horst, C. & Hafner, R. (1998). Atovaquone compared with dapsone for the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who cannot tolerate trimethoprim, sulfonamides, or both. Community Program for Clinical Research on AIDS and the AIDS Clinical Trials Group. *N.Engl.J.Med.*, 339: 1889-1895.
- Ellison, E., Yuen, S. Y., Lawson, L. & Chan, N. H. (1995). Fine-needle aspiration diagnosis of extrapulmonary *Pneumocystis carinii* lymphadenitis in a human immunodeficiency virus positive patient. *Diagn.Cytopathol.*, 12: 251-253.
- Engelberg, L. A., Lerner, C. W. & Tapper, M. L. (1984). Clinical features of *Pneumocystis* pneumonia in the acquired immune deficiency syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 130: 689-694.
- Eriksson, O. E. (1994). *Pneumocystis carinii* a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). *Syst.Ascomycetum*, 13: 165-180.
- Eriksson, O. E. & Winka, K. (1997). Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet.*, 1: 1-16.
- Esteves, F., Gaspar, J., Marques, T., Leite, R., Antunes, F., Mansinho, K. & Matos, O. (2010a). Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clin.Microbiol.Infect.*, 16, 878-884.
- Esteves, F., Gaspar, J., Tavares, A., Moser, I., Antunes, F., Mansinho, K. & Matos, O. (2010b). Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infect.Genet.Evol.*, 10: 192-199.

Esteves, F., Montes-Cano, M. A., de la Horra, C., Costa, M. C., Calderon, E. J., Antunes, F. & Matos, O. (2008). *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin.Microbiol.Infect.*, 14: 356-362.

Esteves, F., Tavares, A., Costa, M. C., Gaspar, J., Antunes, F. & Matos, O. (2009). Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of *Pneumocystis jirovecii*. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 28: 175-178.

Ezekowitz, R. A., Williams, D. J., Koziel, H., Armstrong, M. Y., Warner, A., Richards, F. F. & Rose, R. M. (1991). Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*, 351: 155-158.

Faber, A., Ferreira, G. N., Silva, S. N., Rueff, J. & Gaspar, J. (2005). Multiplex PCR-single-base extension genotyping of multiple glutathione S-transferase polymorphisms. *Biotechnol.Appl.Biochem.*, 41: 9-15.

Fan, J. B., Chen, X., Halushka, M. K., Berno, A., Huang, X., Ryder, T., Lipshutz, R. J., Lockhart, D. J. & Chakravarti, A. (2000). Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res.*, 10: 853-860.

Fenelon, L. E., Keane, C. T., Bakir, M. & Temperley, I. J. (1985). A cluster of *Pneumocystis carinii* infections in children. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)*, 291: 1683.

Fischl, M. A., Dickinson, G. M. & La, V. L. (1988). Safety and efficacy of sulfamethoxazole and trimethoprim chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS. *JAMA*, 259: 1185-1189.

Fisk, D. T., Meshnick, S. & Kazanjian, P. H. (2003). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin.Infect.Dis.*, 36: 70-78.

Fletcher, L. D., McDowell, J. M., Tidwell, R. R., Meagher, R. B. & Dykstra, C. C. (1994). Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding actin I in *Pneumocystis carinii*. *Genetics*, 137: 743-750.

Forrest, J. V. (1972). Radiographic findings in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Radiology*, 103: 539-544.

Fox, D. & Smulian, A. G. (2000). Mkp1 of *Pneumocystis carinii* associates with the yeast transcription factor Rlm1 via a mechanism independent of the activation state. *Cell Signal.*, 12: 381-390.

Frenkel, J. K. (1976). *Pneumocystis jirovecii* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl.Cancer Inst.Monogr*, 43: 13-30.

Frenkel, J. K. (1999). *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 46: 89S-92S.

Frenkel, J. K., Good, J. T. & Shultz, J. A. (1966). Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse, and chemotherapy. *Lab Invest*, 15: 1559-1577.



Furrer, H., Egger, M., Opravil, M., Bernasconi, E., Hirschel, B., Battegay, M., Telenti, A., Vernazza, P. L., Rickenbach, M., Flepp, M. & Malinverni, R. (1999). Discontinuation of primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected adults treated with combination antiretroviral therapy. Swiss HIV Cohort Study. *N.Engl.J.Med.*, 340: 1301-1306.

Gajdusek, D. C. (1976). *Pneumocystis carinii* as the cause of human disease: historical perspective and magnitude of the problem: introductory remarks. *Natl.Cancer Inst.Monogr*, 43: 1-11.

Garbe, T. R. & Stringer, J. R. (1994). Molecular characterization of clustered variants of genes encoding major surface antigens of human *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 62: 3092-3101.

Garner, R. E., Walker, A. N. & Horst, M. N. (1991). Morphologic and biochemical studies of chitin expression in *Pneumocystis carinii*. *J.Protozool.*, 38: 12S-14S.

Gaspar, J., Rodrigues, S., Gil, O. M., Manita, I., Ferreira, T. C., Limbert, E., Goncalves, L., Pina, J. E. & Rueff, J. (2004). Combined effects of glutathione S-transferase polymorphisms and thyroid cancer risk. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 151: 60-67.

Germer, S., Holland, M. J. & Higuchi, R. (2000). High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.*, 10: 258-266.

Gigliotti, F. (1992). Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.*, 165: 329-336.

Gigliotti, F., Harmsen, A. G., Haidaris, C. G. & Haidaris, P. J. (1993). *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infect.Immun.*, 61: 2886-2890.

Gigliotti, F. & Hughes, W. T. (1988). Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models. *J.Clin.Invest*, 81: 1666-1668.

Goesch, T. R., Gotz, G., Stellbrinck, K. H., Albrecht, H., Weh, H. J. & Hossfeld, D. K. (1990). Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between immunodeficient patients. *Lancet*, 336: 627.

Gosey, L. L., Howard, R. M., Witebsky, F. G., Ognibene, F. P., Wu, T. C., Gill, V. J. & MacLowry, J. D. (1985). Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J.Clin.Microbiol.*, 22: 803-807.

Gustafson, M. P., Thomas, C. F., Jr., Rusnak, F., Limper, A. H. & Leof, E. B. (2001). Differential regulation of growth and checkpoint control mediated by a Cdc25 mitotic phosphatase from *Pneumocystis carinii*. *J.Biol.Chem.*, 276: 835-843.

- Gutacker, M. M., Mathema, B., Soini, H., Shashkina, E., Kreiswirth, B. N., Graviss, E. A. & Musser, J. M. (2006). Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J.Infect.Dis.*, 193: 121-128.
- Haque, K. A., Pfeiffer, R. M., Beerman, M. B., Struewing, J. P., Chanock, S. J. & Bergen, A. W. (2003). Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC.Biotechnol.*, 3: 20.
- Harris, J. E. (1990). Improved short-term survival of AIDS patients initially diagnosed with *Pneumocystis carinii* pneumonia, 1984 through 1987. *JAMA*, 263: 397-401.
- Hasleton, P. S., Curry, A. & Rankin, E. M. (1981). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a light microscopical and ultrastructural study. *J.Clin.Pathol.*, 34: 1138-1146.
- Hastings, I. M. & Donnelly, M. J. (2005). The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist.Updat.*, 8: 43-50.
- Hauser, P., Rabodonirina, M. & Nevez, G. (2009). Hypothetical *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg.Infect.Dis.*, 15: 506-507.
- Hauser, P. M., Blanc, D. S., Bille, J. & Francioli, P. (1998). Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 22: 27-35.
- Hauser, P. M., Blanc, D. S., Sudre, P., Senggen, M. E., Nahimana, A., Bille, J., Weber, R. & Francioli, P. (2001a). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. *AIDS*, 15: 461-466.
- Hauser, P. M., Francioli, P., Bille, J., Telenti, A. & Blanc, D. S. (1997a). Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* by single-strand conformation polymorphism of four genomic regions. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 3086-3091.
- Hauser, P. M., Francioli, P., Bille, J., Telenti, A. & Blanc, D. S. (1997b). Typing of *Pneumocystis carinii* sp.f. *hominis* by PCR-SSCP of four genomic regions. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 44: 16S.
- Hauser, P. M., Sudre, P., Nahimana, A. & Francioli, P. (2001b). Prophylaxis failure is associated with a specific *Pneumocystis carinii* genotype. *Clin.Infect.Dis.*, 33: 1080-1082.
- Haverkos, H. W. (1984). Assessment of therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. PCP Therapy Project Group. *Am.J.Med.*, 76: 501-508.
- Hay, J. W., Osmond, D. H. & Jacobson, M. A. (1988). Projecting the medical costs of AIDS and ARC in the United States. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*, 1: 466-485.
- Helweg-Larsen, J., Benfield, T. L., Eugen-Olsen, J., Lundgren, J. D. & Lundgren, B. (1999). Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet*, 354: 1347-1351.

- Helweg-Larsen, J., Eugen-Olsen, J. & Lundgren, B. (2000). Rapid detection of dihydropteroate polymorphism in AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia by restriction fragment length polymorphism. *Scand.J.Infect.Dis.*, 32: 481-483.
- Helweg-Larsen, J., Jensen, J. S. & Lundgren, B. (1997). Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by PCR on oral washes. *Lancet*, 350: 1363.
- Helweg-Larsen, J., Lee, C. H., Jin, S., Hsueh, J. Y., Benfield, T. L., Hansen, J., Lundgren, J. D. & Lundgren, B. (2001). Clinical correlation of variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis*. *AIDS*, 15: 451-459.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23: 504-511.
- Hirschhorn, J. N., Sklar, P., Lindblad-Toh, K., Lim, Y. M., Ruiz-Gutierrez, M., Bolk, S., Langhorst, B., Schaffner, S., Winchester, E. & Lander, E. S. (2000). SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97: 12164-12169.
- Hocker, B., Wendt, C., Nahimana, A., Tonshoff, B. & Hauser, P. M. (2005). Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerg.Infect.Dis.*, 11: 330-332.
- Hoffman, O. A., Standing, J. E. & Limper, A. H. (1993). *Pneumocystis carinii* stimulates tumor necrosis factor-alpha release from alveolar macrophages through a beta-glucan-mediated mechanism. *J.Immunol.*, 150: 3932-3940.
- Holten-Andersen, W. & Kolmos, H. J. (1989). Comparison of methenamine silver nitrate and Giemsa stain for detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from HIV infected patients. *APMIS*, 97: 745-747.
- Hong, S. T., Park, Y. K., Kim, J., Kim, D. H. & Yun, C. K. (1999). Is *Pneumocystis carinii* vertically transmitted to neonatal rats? *Korean J.Parasitol.*, 37: 149-156.
- Hong, S. T., Steele, P. E., Cushion, M. T., Walzer, P. D., Stringer, S. L. & Stringer, J. R. (1990). *Pneumocystis carinii* karyotypes. *J.Clin.Microbiol.*, 28: 1785-1795.
- Hong, Y. L., Hossler, P. A., Calhoun, D. H. & Meshnick, S. R. (1995). Inhibition of recombinant *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 39: 1756-1763.
- Hoover, D. R., Saah, A. J., Bacellar, H., Phair, J., Detels, R., Anderson, R. & Kaslow, R. A. (1993). Clinical manifestations of AIDS in the era of *Pneumocystis* prophylaxis. Multicenter AIDS Cohort Study. *N.Engl.J.Med.*, 329: 1922-1926.
- Huang, L., Beard, C. B., Creasman, J., Levy, D., Duchin, J. S., Lee, S., Pieniazek, N., Carter, J. L., Del, R. C., Rimland, D. & Navin, T. R. (2000). Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J.Infect.Dis.*, 182: 1192-1198.

Huang, L., Crothers, K., Atzori, C., Benfield, T., Miller, R., Rabodonirina, M. & Helweg-Larsen, J. (2004). Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg.Infect.Dis.*, 10: 1721-1728.

Huang, L., Welsh, D. A., Miller, R. F., Beard, C. B., Lawrence, G. G., Fox, M., Swartzman, A., Bensley, M. R., Carbonnet, D., Davis, J. L., Chi, A., Yoo, B. J. & Jones, J. L. (2006). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations and human immunodeficiency virus-associated *Pneumocystis* pneumonia. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 53 Suppl 1: S114-S116.

Huang, S. N., Fischer, S. H., O'Shaughnessy, E., Gill, V. J., Masur, H. & Kovacs, J. A. (1999). Development of a PCR assay for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia based on amplification of the multicopy major surface glycoprotein gene family. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 35: 27-32.

Huggett, J. F., Taylor, M. S., Kocjan, G., Evans, H. E., Morris-Jones, S., Gant, V., Novak, T., Costello, A. M., Zumla, A. & Miller, R. F. (2008). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*, 63: 154-159.

Hughes, W., Leoung, G., Kramer, F., Bozzette, S. A., Safrin, S., Frame, P., Clumeck, N., Masur, H., Lancaster, D., Chan, C., *et al.* (1993). Comparison of atovaquone (566C80) with trimethoprim-sulfamethoxazole to treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *N.Engl.J.Med.*, 328: 1521-1527.

Hughes, W. T. (1998). Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carinii*. *Semin.Respir.Infect.*, 13: 283-288.

Hughes, W. T. (1994). Clinical manifestations in children. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 319-329).

Hughes, W. T. (1995a). *Pneumocystis* in infants and children. *N.Engl.J.Med.*, 333: 320-321.

Hughes, W. T. (1982). Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.*, 145: 842-848.

Hughes, W. T. (1995b). The role of atovaquone tablets in treating *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.Hum.Retrovirol.*, 8: 247-252.

Hughes, W. T., Feldman, S. & Sanyal, S. K. (1975). Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Can.Med.Assoc.J.*, 112: 47-50.

Hughes, W. T., Kuhn, S., Chaudhary, S., Feldman, S., Verzosa, M., Aur, R. J., Pratt, C. & George, S. L. (1977). Successful chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *N.Engl.J.Med.*, 297: 1419-1426.

Hughes, W. T., McNabb, P. C., Makres, T. D. & Feldman, S. (1974). Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 5: 289-293.

- Hunter, J. A. & Wakefield, A. E. (1996). Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 43: 24S-25S.
- Inbar, E., Yakir, B. & Darvasi, A. (2002). An efficient haplotyping method with DNA pools. *Nucleic Acids Res.*, 30: e76.
- Ioannidis, J. P., Cappelleri, J. C., Skolnik, P. R., Lau, J. & Sacks, H. S. (1996). A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of *Pneumocystis carinii* prophylactic regimens. *Arch.Intern.Med.*, 156: 177-188.
- Itatani, C. A. (1996). Ultrastructural morphology of intermediate forms and forms suggestive of conjugation in the life cycle of *Pneumocystis carinii*. *J.Parasitol.*, 82: 163-171.
- Itatani, C. A. & Marshall, G. J. (1988). Ultrastructural morphology and staining characteristics of *Pneumocystis carinii* in situ and from bronchoalveolar lavage. *J.Parasitol.*, 74: 700-712.
- Ivády, G. & Páldy, L. (1958). A new form of treatment of interstitial plasmecellpneumonia in prematur infants with pentavalent antimony and aromatic diamides. *Monatsschr.Kinderheilkd.*, 106: 10-14.
- Ivanetich, K. M. & Santi, D. V. (1990). Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *FASEB J.*, 4: 1591-1597.
- Jacobs, J. L., Libby, D. M., Winters, R. A., Gelmont, D. M., Fried, E. D., Hartman, B. J. & Laurence, J. (1991). A cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in adults without predisposing illnesses. *N.Engl.J.Med.*, 324: 246-250.
- Jimenez, M., Alvar, J. & Tibayrenc, M. (1997). *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. *AIDS*, 11: 569-573.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. (2008). UNAIDS Report on the global HIV/AIDS epidemic 2008: executive summary.
- Kaiser, K., Rabodonirina, M., Mayencon, M. & Picot, S. (1999). Evidence for cdc2 gene in *Pneumocystis carinii hominis* and its implication for culture. *AIDS*, 13: 419-420.
- Kaneshiro, E. S. (1998). *Pneumocystis carinii* pneumonia: the status of *Pneumocystis* biochemistry. *Int.J.Parasitol.*, 28: 65-84.
- Kaneshiro, E. S., Amit, Z., Chandra, J., Baughman, R. P., Contini, C. & Lundgren, B. (1999). Sterols of *Pneumocystis carinii hominis* organisms isolated from human lungs. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 6: 970-976.
- Kaneshiro, E. S. & Sleight, R. G. (1994). Biochemistry and Metabolism. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 45-71).
- Kang, D. & Hamasaki, N. (2003). Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin.Chem.Lab Med.*, 41: 1281-1288.

Kaplan, J. E., Hanson, D., Dworkin, M. S., Frederick, T., Bertolli, J., Lindegren, M. L., Holmberg, S. & Jones, J. L. (2000). Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin.Infect.Dis.*, 30 Suppl 1: S5-14.

Kaplan, J. E., Hanson, D. L., Navin, T. R. & Jones, J. L. (1998). Risk factors for primary *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected adolescents and adults in the United States: reassessment of indications for chemoprophylaxis. *J.Infect.Dis.*, 178: 1126-1132.

Kaplan, J. E., Masur, H. & Holmes, K. K. (2002). Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons-2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm.Rep.*, 51: 1-52.

Kazanjian, P., Armstrong, W., Hossler, P. A., Burman, W., Richardson, J., Lee, C. H., Crane, L., Katz, J. & Meshnick, S. R. (2000). *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J.Infect.Dis.*, 182: 551-557.

Kazanjian, P., Armstrong, W., Hossler, P. A., Lee, C. H., Huang, L., Beard, C. B., Carter, J., Crane, L., Duchin, J., Burman, W., Richardson, J. & Meshnick, S. R. (2001). *Pneumocystis carinii* cytochrome b mutations are associated with atovaquone exposure in patients with AIDS. *J.Infect.Dis.*, 183: 819-822.

Kazanjian, P., Locke, A. B., Hossler, P. A., Lane, B. R., Bartlett, M. S., Smith, J. W., Cannon, M. & Meshnick, S. R. (1998). *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS*, 12: 873-878.

Kazanjian, P. H., Fisk, D., Armstrong, W., Shulin, Q., Liwei, H., Ke, Z. & Meshnick, S. (2004). Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. *J.Infect.Dis.*, 189: 1684-1687.

Kedzierska, K., Azzam, R., Ellery, P., Mak, J., Jaworowski, A. & Crowe, S. M. (2003). Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J.Clin.Virol.*, 26: 247-263.

Keely, S., Pai, H. J., Baughman, R., Sidman, C., Sunkin, S. M., Stringer, J. R. & Stringer, S. L. (1994). *Pneumocystis* species inferred from analysis of multiple genes. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 94S.

Keely, S. P. & Stringer, J. R. (1997). Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 2745-2747.

Keely, S. P., Stringer, J. R., Baughman, R. P., Linke, M. J., Walzer, P. D. & Smulian, A. G. (1995). Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. *J.Infect.Dis.*, 172: 595-598.

Kim, S. & Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu.Rev.Biomed.Eng.*, 9: 289-320.

- Kim, S. Y., Dabb, A. A., Glenn, D. J., Snyder, K. M., Chuk, M. K. & Loeb, D. M. (2008). Intravenous pentamidine is effective as second line *Pneumocystis* pneumonia prophylaxis in pediatric oncology patients. *Pediatr.Blood Cancer*, 50: 779-783.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I. W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V. & Gottesman, M. M. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525-528.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. (2001). Dictionary of the Fungi, 9ª Edição. CABI Publishing, CAB International, Wallingford.
- Klein, N. C., Duncanson, F. P., Lenox, T. H., Forszpaniak, C., Sherer, C. B., Quentzel, H., Nunez, M., Suarez, M., Kawwaff, O., Pitta-Alvarez, A., *et al.* (1992). Trimethoprim-sulfamethoxazole versus pentamidine for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients: results of a large prospective randomized treatment trial. *AIDS*, 6: 301-305.
- Koletar, S. L., Heald, A. E., Finkelstein, D., Hafner, R., Currier, J. S., McCutchan, J. A., Vallee, M., Torriani, F. J., Powderly, W. G., Fass, R. J. & Murphy, R. L. (2001). A prospective study of discontinuing primary and secondary *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after CD4 cell count increase to  $> 200 \times 10^6 /l$ . *AIDS*, 15: 1509-1515.
- Kottom, T. J., Thomas, C. F., Jr., Mubarak, K. K., Leof, E. B. & Limper, A. H. (2000). *Pneumocystis carinii* uses a functional cdc13 B-type cyclin complex during its life cycle. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 22: 722-731.
- Kovacs, J. A., Allegra, C. J., Beaver, J., Boarman, D., Lewis, M., Parrillo, J. E., Chabner, B. & Masur, H. (1989a). Characterization of de novo folate synthesis in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*: potential for screening therapeutic agents. *J.Infect.Dis.*, 160: 312-320.
- Kovacs, J. A., Gill, V. J., Meshnick, S. & Masur, H. (2001). New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA*, 286: 2450-2460.
- Kovacs, J. A., Halpern, J. L., Lundgren, B., Swan, J. C., Parrillo, J. E. & Masur, H. (1989b). Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*: identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates. *J.Infect.Dis.*, 159: 60-70.
- Kovacs, J. A., Hiemenz, J. W., Macher, A. M., Stover, D., Murray, H. W., Shelhamer, J., Lane, H. C., Urmacher, C., Honig, C., Longo, D. L., *et al.* (1984). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Ann.Intern.Med.*, 100: 663-671.
- Kovacs, J. A. & Masur, H. (1992). Prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin.Infect.Dis.*, 14: 1005-1009.

- Kovacs, J. A., Ng, V. L., Masur, H., Leoung, G., Hadley, W. K., Evans, G., Lane, H. C., Ognibene, F. P., Shelhamer, J., Parrillo, J. E., *et al.* (1988). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N.Engl.J.Med.*, 318: 589-593.
- Kovacs, J. A., Powell, F., Edman, J. C., Lundgren, B., Martinez, A., Drew, B. & Angus, C. W. (1993). Multiple genes encode the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J.Biol.Chem.*, 268: 6034-6040.
- Kramer, M. R., Stoeckl, C., Lewiston, N. J., Starnes, V. A. & Theodore, J. (1992). Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis for *Pneumocystis carinii* infections in heart-lung and lung transplantation-how effective and for how long? *Transplantation*, 53: 586-589.
- Kumar, S. D. & Krieger, B. P. (1998). CD4 lymphocyte counts and mortality in AIDS patients requiring mechanical ventilator support due to *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest*, 113: 430-433.
- Kutty, G., Huang, S. N. & Kovacs, J. A. (2003). Characterization of thioredoxin reductase genes (*trr1*) from *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis jirovecii*. *Gene*, 310: 175-183.
- Kutty, G. & Kovacs, J. A. (2003). A single-copy gene encodes Kex1, a serine endoprotease of *Pneumocystis jirovecii*. *Infect.Immun.*, 71: 571-574.
- Kutty, G., Ma, L. & Kovacs, J. A. (2001). Characterization of the expression site of the major surface glycoprotein of human-derived *Pneumocystis carinii*. *Mol.Microbiol.*, 42: 183-193.
- Kutty, G., Maldarelli, F., Achaz, G. & Kovacs, J. A. (2008). Variation in the major surface glycoprotein genes in *Pneumocystis jirovecii*. *J.Infect.Dis.*, 198: 741-749.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B. & Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, 28: 655-661.
- Lane, B. R., Ast, J. C., Hossler, P. A., Mindell, D. P., Bartlett, M. S., Smith, J. W. & Meshnick, S. R. (1997). Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.*, 175: 482-485.
- Latouche, S., Lacube, P., Maury, E., Bolognini, J., Develoux, M., Girard, P. M., Godet, C., Lebrétte, M. G., Mayaud, C., Guillot, J. & Roux, P. (2003). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998-2001 prospective study. *Med.Mycol.*, 41: 533-537.
- Latouche, S., Ortona, E., Mazars, E., Margutti, P., Tamburrini, E., Siracusano, A., Guyot, K., Nigou, M. & Roux, P. (1997a). Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 383-387.



- Latouche, S., Poirot, J. L., Bernard, C. & Roux, P. (1997b). Study of internal transcribed spacer and mitochondrial large-subunit genes of *Pneumocystis carinii hominis* isolated by repeated bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus-infected patients during one or several episodes of pneumonia. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 1687-1690.
- Lautenschlager, I., Lyytikainen, O., Jokipii, L., Jokipii, A., Maiche, A., Ruutu, T., Tukiainen, P. & Ruutu, P. (1996). Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 728-730.
- Le Hellard, S., Ballereau, S. J., Visscher, P. M., Torrance, H. S., Pinson, J., Morris, S. W., Thomson, M. L., Semple, C. A., Muir, W. J., Blackwood, D. H., Porteous, D. J. & Evans, K. L. (2002). SNP genotyping on pooled DNAs: comparison of genotyping technologies and a semi automated method for data storage and analysis. *Nucleic Acids Res.*, 30: e74.
- Lee, C. H., Helweg-Larsen, J., Tang, X., Jin, S., Li, B., Bartlett, M. S., Lu, J. J., Lundgren, B., Lundgren, J. D., Olsson, M., Lucas, S. B., Roux, P., Cargnel, A., Atzori, C., Matos, O. & Smith, J. W. (1998). Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J.Clin.Microbiol.*, 36: 734-741.
- Lee, C. H., Lu, J. J., Bartlett, M. S., Durkin, M. M., Liu, T. H., Wang, J., Jiang, B. & Smith, J. W. (1993). Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 754-757.
- Lee, L. H., Gigliotti, F., Wright, T. W., Simpson-Haidaris, P. J., Weinberg, G. A. & Haidaris, C. G. (2000). Molecular characterization of KEX1, a kexin-like protease in mouse *Pneumocystis carinii*. *Gene*, 242: 141-150.
- Leigh, T. R., Millett, M. J., Jameson, B. & Collins, J. V. (1993). Serum titres of *Pneumocystis carinii* antibody in health care workers caring for patients with AIDS. *Thorax*, 48: 619-621.
- Li, K., He, A., Cai, W. P., Tang, X. P., Zheng, X. Y., Li, Z. Y. & Zhan, X. M. (2009). Absence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among samples from a group of AIDS patients in China. *Scand.J.Infect.Dis.*, 41: 152-154.
- Limper, A. H., Hoyte, J. S. & Standing, J. E. (1997). The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung. *J.Clin.Invest*, 99: 2110-2117.
- Lindroos, K., Liljedahl, U. & Syvanen, A. C. (2003). Genotyping SNPs by minisequencing primer extension using oligonucleotide microarrays. *Methods Mol.Biol.*, 212: 149-165.
- Lindroos, K., Sigurdsson, S., Johansson, K., Ronnblom, L. & Syvanen, A. C. (2002). Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res.*, 30: e70.

- Linke, M. J., Cushion, M. T. & Walzer, P. D. (1989). Properties of the major antigens of rat and human *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 57: 1547-1555.
- Linke, M. J., Smulian, A. G., Yoshihara, P. & Walzer, P. D. (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 99S-100S.
- Lipschik, G. Y., Masur, H. & Kovacs, J. A. (1991). Polyamine metabolism in *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.*, 163: 1121-1127.
- Liu, Y., Rocourt, M., Pan, S., Liu, C. & Leibowitz, M. J. (1992). Sequence and variability of the 5.8S and 26S rRNA genes of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res.*, 20: 3763-3772.
- Longo, M. C., Berninger, M. S. & Hartley, J. L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93: 125-128.
- Lorand, T. & Kocsis, B. (2007). Recent advances in antifungal agents. *Mini.Rev.Med.Chem.*, 7: 900-911.
- Lu, J. J., Bartlett, M. S., Shaw, M. M., Queener, S. F., Smith, J. W., Ortiz-Rivera, M., Leibowitz, M. J. & Lee, C. H. (1994). Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J.Clin.Microbiol.*, 32: 2904-2912.
- Lu, J. J., Bartlett, M. S., Smith, J. W. & Lee, C. H. (1995). Typing of *Pneumocystis carinii* strains with type-specific oligonucleotide probes derived from nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J.Clin.Microbiol.*, 33: 2973-2977.
- Lu, J. J. & Lee, C. H. (2008). *Pneumocystis* pneumonia. *J.Formos.Med.Assoc.*, 107: 830-842.
- Lucas, S. B., Peacock, C. S., Hounnou, A., Brattegaard, K., Koffi, K., Honde, M., Andoh, J., Bell, J. & De Cock, K. M. (1996). Disease in children infected with HIV in Abidjan, Cote d'Ivoire. *BMJ*, 312: 335-338.
- Lugli, E. B., Allen, A. G. & Wakefield, A. E. (1997). A *Pneumocystis carinii* multi-gene family with homology to subtilisin-like serine proteases. *Microbiology*, 143 ( Pt 7): 2223-2236.
- Lugli, E. B., Bampton, E. T., Ferguson, D. J. & Wakefield, A. E. (1999). Cell surface protease PRT1 identified in the fungal pathogen *Pneumocystis carinii*. *Mol.Microbiol.*, 31: 1723-1733.
- Lund, F. E., Schuer, K., Hollifield, M., Randall, T. D. & Garvy, B. A. (2003). Clearance of *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on B cells but not on *P. carinii*-specific antibody. *J.Immunol.*, 171: 1423-1430.
- Lundberg, B. E., Davidson, A. J. & Burman, W. J. (2000). Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in an era of effective prophylaxis: the relative contribution of non-adherence and drug failure. *AIDS*, 14: 2559-2566.

Lundgren, B., Elvin, K., Rothman, L. P., Ljungstrom, I., Lidman, C. & Lundgren, J. D. (1997). Transmission of *Pneumocystis carinii* from patients to hospital staff. *Thorax*, 52: 422-424.

Lundgren, B., Lebech, M., Lind, K., Nielsen, J. O. & Lundgren, J. D. (1993). Antibody response to a major human *Pneumocystis carinii* surface antigen in patients without evidence of immunosuppression and in patients with suspected atypical pneumonia. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 12: 105-109.

Lundgren, B. & Wakefield, A. E. (1998). PCR for detecting *Pneumocystis carinii* in clinical or environmental samples. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 22: 97-101.

Lundgren, J. D., Barton, S. E., Lazzarin, A., Danner, S., Goebel, F. D., Pehrson, P., Mulcahy, F., Kosmidis, J., Pedersen, C. & Phillips, A. N. (1995). Factors associated with the development of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 5,025 European patients with AIDS. AIDS in Europe Study Group. *Clin.Infect.Dis.*, 21: 106-113.

Ma, L., Borio, L., Masur, H. & Kovacs, J. A. (1999). *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *J.Infect.Dis.*, 180: 1969-1978.

Ma, L. & Kovacs, J. A. (2001). Genetic analysis of multiple loci suggests that mutations in the *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* dihydropteroate synthase gene arose independently in multiple strains. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 45: 3213-3215.

Ma, L., Kutty, G., Jia, Q., Imamichi, H., Huang, L., Atzori, C., Beckers, P., Groner, G., Beard, C. B. & Kovacs, J. A. (2002). Analysis of variation in tandem repeats in the intron of the major surface glycoprotein expression site of the human form of *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.*, 186: 1647-1654.

Malin, A. S., Gwanzura, L. K., Klein, S., Robertson, V. J., Musvaire, P. & Mason, P. R. (1995). *Pneumocystis carinii* pneumonia in Zimbabwe. *Lancet*, 346: 1258-1261.

Mandujano, J. F., D'Souza, N. B., Nelson, S., Summer, W. R., Beckerman, R. C. & Shellito, J. E. (1995). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 151: 1233-1238.

Markoulatos, P., Siafakas, N. & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J.Clin.Lab Anal.*, 16: 47-51.

Martin, J. N., Rose, D. A., Hadley, W. K., Perdreau-Remington, F., Lam, P. K. & Gerberding, J. L. (1999). Emergence of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in the AIDS era. *J.Infect.Dis.*, 180: 1809-1818.

Martin, M. A., Cox, P. H., Beck, K., Styer, C. M. & Beall, G. N. (1992). A comparison of the effectiveness of three regimens in the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients. *Arch.Intern.Med.*, 152: 523-528.

Mason, G. R., Hashimoto, C. H., Dickman, P. S., Foutty, L. F. & Cobb, C. J. (1989). Prognostic implications of bronchoalveolar lavage neutrophilia in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia and AIDS. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 139: 1336-1342.

- Masur, H. (1992a). Prevention and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. *N.Engl.J.Med.*, 327: 1853-1860.
- Masur, H. (1992b). Prophylaxis and therapy for *Pneumocystis* pneumonia-where are we? *Infect.Agents Dis.*, 1: 270-278.
- Masur, H., Kaplan, J. E. & Holmes, K. K. (2002). Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons-2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *Ann.Intern.Med.*, 137: 435-478.
- Masur, H., Ognibene, F. P., Yarchoan, R., Shelhamer, J. H., Baird, B. F., Travis, W., Suffredini, A. F., Deyton, L., Kovacs, J. A., Falloon, J., *et al.* (1989). CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann.Intern.Med.*, 111: 223-231.
- Matos, O. (1999). Epidemiologia e diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Contribuição para a avaliação de técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico da pneumocistose. Tese de dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Matos, O., Ângelo, H. & Antunes, F. (2008). Protozoários oportunistas e *Pneumocystis jirovecii*. In: Manual sobre SIDA, 3ª edição. Francisco Antunes (Editor). Permanyer Portugal. (pp. 141-158).
- Matos, O., Azevedo, P., Caldeira, L., Mendes, A. C., Araújo, A. T., Forte, M. & Antunes, F. (1995). Estudo comparativo de três métodos morfológicos para diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PPC) em infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH). *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 18: 135-138.
- Matos, O., Costa, M. C., Correia, I., Monteiro, P., Monteiro, M., Soares, J., Vieira, J. R., Bonnet, M. & Antunes, F. (2003a). *Pneumocystis jirovecii* carriage in Portuguese immunocompetent patients: preliminary results. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 50 Suppl, 647-648.
- Matos, O., Costa, M. C., Correia, I., Monteiro, P., Vieira, J. R., Soares, J., Bonnet, M., Esteves, F. & Antunes, F. (2006). [*Pneumocystis jirovecii* infection in immunocompetent patients with pulmonary disorders, in Portugal]. *Acta Med.Port.*, 19: 121-126.
- Matos, O., Costa, M. C., Lundgren, B., Caldeira, L., Aguiar, P. & Antunes, F. (2001). Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 20: 573-575.
- Matos, O. & Esteves, F. (2010a). Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* (Frenkel, 1976) dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite*. (no prelo).
- Matos, O. & Esteves, F. (2010b). *Pneumocystis jirovecii* multilocus gene sequencing and the impact on epidemiology and clinical course of infection. *Future Microbiol.* (no prelo).

Matos, O., Lee, C. H., Jin, S., Li, B., Costa, M. C., Goncalves, L. & Antunes, F. (2003b). *Pneumocystis jiroveci* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect.Genet.Evol.*, 3: 281-285.

Matos, O., Lundgren, B., Caldeira, L., Mansinho, K., Aguiar, P., Forte, M. & Antunes, F. (1999). Evaluation of a nested PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in serum from immunocompromised patients. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 46: 104S-105S.

Matos, O., Lundgren, B., Caldeira, L., Mansinho, K., Aguiar, P., Forte, M. & Antunes, F. (2000). Evaluation of two nested polymerase chain reactions for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clin.Microbiol.Infect.*, 6: 149-151.

Matsumoto, Y., Matsuda, S. & Tegoshi, T. (1989). Yeast glucan in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *J.Protozool.*, 36: 21S-22S.

Matsumoto, Y. & Yoshida, Y. (1986). Advances in *Pneumocystis* biology. *Parasitol.Today*, 2: 137-142.

Matsumoto, Y. & Yoshida, Y. (1984). Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J.Protozool.*, 31: 420-428.

May, T., Beuscart, C., Reynes, J., Marchou, B., Leclercq, P., Borsa, L. F., Saba, J., Micoud, M., Mouton, Y. & Canton, P. (1994). Trimethoprim-sulfamethoxazole versus aerosolized pentamidine for primary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: a prospective, randomized, controlled clinical trial. LFPMI Study Group. Ligue Francaise de Prevention des Maladies Infectieuses. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*, 7: 457-462.

Mazars, E., Odberg-Ferragut, C., Dei-Cas, E., Fourmaux, M. N., Aliouat, E. M., Brun-Pascaud, M., Mougeot, G. & Camus, D. (1995). Polymorphism of the thymidylate synthase gene of *Pneumocystis carinii* from different host species. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 42: 26-32.

Mazars, E., Odberg-Ferragut, C., Durand, I., Tibayrenc, M., Dei-Cas, E. & Camus, D. (1994). Genomic and isoenzymatic markers of *Pneumocystis* from different host species. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 104S.

Mazer, M. A., Kovacs, J. A., Swan, J. C., Parrillo, J. E. & Masur, H. (1987). Histoenzymological study of selected dehydrogenase enzymes in *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 55: 727-730.

McFadden, D. C., Tomavo, S., Berry, E. A. & Boothroyd, J. C. (2000). Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 108: 1-12.

McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S. & Nichols, G. L. (2000). Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J.Clin.Microbiol.*, 38: 3984-3990.

- McNabb, S. J., Graves, D. C., Kosanke, S. D., Moyer, M. J. & Ivey, M. H. (1988). *Pneumocystis carinii* antigen detection in rat serum and lung lavage. *J.Clin.Microbiol.*, 26: 1763-1771.
- Meade, J. C. & Stringer, J. R. (1991). PCR amplification of DNA sequences from the transcription factor IID and cation transporting ATPase genes in *Pneumocystis carinii*. *J.Protozool.*, 38: 66S-68S.
- Meade, J. C. & Stringer, J. R. (1995). Cloning and characterization of an ATPase gene from *Pneumocystis carinii* which closely resembles fungal H<sup>+</sup> ATPases. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 42: 298-307.
- Medrano, F. J., Montes-Cano, M., Conde, M., de la Horra, C., Respaldiza, N., Gasch, A., Perez-Lozano, M. J., Varela, J. M. & Calderon, E. J. (2005). *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg.Infect.Dis.*, 11: 245-250.
- Mei, Q., Gurunathan, S., Masur, H. & Kovacs, J. A. (1998). Failure of co-trimoxazole in *Pneumocystis carinii* infection and mutations in dihydropteroate synthase gene. *Lancet*, 351: 1631-1632.
- Merali, S. & Clarkson, A. B., Jr. (2004). S-adenosylmethionine and *Pneumocystis*. *FEMS Microbiol.Lett.*, 237: 179-186.
- Meshnick, S. R., Berry, E. A., Nett, J., Kazanjian, P. & Trumpower, B. (2001). The interaction of atovaquone with the *P. carinii* cytochrome bc1 complex. *J.Eukaryot.Microbiol.*, Suppl: 169S-171S.
- Milder, J. E., Walzer, P. D., Coonrod, J. D. & Rutledge, M. E. (1980). Comparison of histological and immunological techniques for detection of *Pneumocystis carinii* in rat bronchial lavage fluid. *J.Clin.Microbiol.*, 11: 409-417.
- Miller, R. F., Ambrose, H. E., Novelli, V. & Wakefield, A. E. (2002). Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. *J.Clin.Microbiol.*, 40: 1555-1557.
- Miller, R. F., Ambrose, H. E. & Wakefield, A. E. (2001). *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J.Clin.Microbiol.*, 39: 3877-3882.
- Miller, R. F., Evans, H. E., Copas, A. J. & Cassell, J. A. (2007). Climate and genotypes of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin.Microbiol.Infect.*, 13: 445-448.
- Miller, R. F., Lindley, A. R., Ambrose, H. E., iouat-Denis, C. M. & Wakefield, A. E. (2003a). Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* from adult HIV-infected patients with *Pneumocystis* pneumonia. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 50 Suppl: 654-655.
- Miller, R. F., Lindley, A. R., Ambrose, H. E., Malin, A. S. & Wakefield, A. E. (2003b). Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 47: 3979-3981.

Miller, R. F., Lindley, A. R., Copas, A., Ambrose, H. E., Davies, R. J. & Wakefield, A. E. (2005a). Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain. *Thorax*, 60: 679-682.

Miller, R. F., Lindley, A. R., Malin, A. S., Ambrose, H. E. & Wakefield, A. E. (2005b). Isolates of *Pneumocystis jirovecii* from Harare show high genotypic similarity to isolates from London at the superoxide dismutase locus. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 99: 202-206.

Miller, R. F. & Wakefield, A. E. (1999). *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia. *Lancet*, 353: 2039-2040.

Mocroft, A., Katlama, C., Johnson, A. M., Pradier, C., Antunes, F., Mulcahy, F., Chiesi, A., Phillips, A. N., Kirk, O. & Lundgren, J. D. (2000). AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet*, 356: 291-296.

Moe, A. A. & Hardy, W. D. (1994). *Pneumocystis carinii* infection in the HIV-seropositive patient. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, 8: 331-364.

Mohar, A., Romo, J., Salido, F., Jessurun, J., Ponce de, L. S., Reyes, E., Volkow, P., Larraza, O., Peredo, M. A., Cano, C., *et al.* (1992). The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of autopsied patients in Mexico. *AIDS*, 6: 467-473.

Montes-Cano, M. A., Chabe, M., Fontillon-Alberdi, M., de la Horra, C., Respaldiza, N., Medrano, F. J., Varela, J. M., Dei-Cas, E. & Calderon, E. J. (2009). Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerg.Infect.Dis.*, 15: 125-127.

Montes-Cano, M. A., de la Horra, C., Martin-Juan, J., Varela, J. M., Torronteras, R., Respaldiza, N., Medrano, F. J. & Calderon, E. J. (2004). *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. *Clin.Infect.Dis.*, 39: 123-128.

Montgomery, A. B., Feigal, D. W., Jr., Sattler, F., Mason, G. R., Catanzaro, A., Edison, R., Markowitz, N., Johnson, E., Ogawa, S., Rovzar, M., *et al.* (1995). Pentamidine aerosol versus trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis carinii* in acquired immune deficiency syndrome. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 151: 1068-1074.

Moonens, F., Liesnard, C., Brancart, F., Van Vooren, J. P. & Serruys, E. (1995). Rapid simple and nested polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand.J.Infect.Dis.*, 27: 358-362.

Morris, A., Lundgren, J. D., Masur, H., Walzer, P. D., Hanson, D. L., Frederick, T., Huang, L., Beard, C. B. & Kaplan, J. E. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg.Infect.Dis.*, 10: 1713-1720.

Mortier, E., Pouchot, J., Bossi, P. & Molinie, V. (1995). Maternal-fetal transmission of *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus infection. *N.Engl.J.Med.*, 332: 825.

Musto, L., Flanagan, M. & Elbadawi, A. (1982). Ten-minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 106: 292-294.

Nadler, S. A. (1995). Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *J.Parasitol.*, 81: 395-403.

Nahimana, A., Francioli, P., Blanc, D. S., Bille, J., Wakefield, A. E. & Hauser, P. M. (2000). Determination of the copy number of the nuclear rDNA and beta-tubulin genes of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* using PCR multicompeters. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 47: 368-372.

Nahimana, A., Rabodonirina, M., Bille, J., Francioli, P. & Hauser, P. M. (2004). Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 48: 4301-4305.

Nahimana, A., Rabodonirina, M., Helweg-Larsen, J., Meneau, I., Francioli, P., Bille, J. & Hauser, P. M. (2003). Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerg.Infect.Dis.*, 9: 864-867.

Nakamura, Y. & Wada, M. (1998). Molecular pathobiology and antigenic variation of *Pneumocystis carinii*. *Adv.Parasitol.*, 41: 63-107.

Nassar, A., Zapata, M., Little, J. V. & Siddiqui, M. T. (2006). Utility of reflex Gomori methenamine silver staining for *Pneumocystis jirovecii* on bronchoalveolar lavage cytologic specimens: a review. *Diagn.Cytopathol.*, 34: 719-723.

Navin, T. R., Rimland, D., Lennox, J. L., Jernigan, J., Cetron, M., Hightower, A., Roberts, J. M. & Kaplan, J. E. (2000). Risk factors for community-acquired pneumonia among persons infected with human immunodeficiency virus. *J.Infect.Dis.*, 181: 158-164.

Nevez, G., Jounieaux, V., Linas, M. D., Guyot, K., Leophonte, P., Massip, P., Schmit, J. L., Seguela, J. P., Camus, D., Dei-Cas, E., Raccurt, C. & Mazars, E. (1997). High frequency of *Pneumocystis carinii* sp.f. *hominis* colonization in HIV-negative patients. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 44: 36S.

Nevez, G., Raccurt, C., Vincent, P., Jounieaux, V. & Dei-Cas, E. (1999). Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4<sup>+</sup> T cell counts. *Clin.Infect.Dis.*, 29: 1331-1332.

Nevez, G., Totet, A., Pautard, J. C. & Raccurt, C. (2001). *Pneumocystis carinii* detection using nested-PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis. *J.Eukaryot.Microbiol.*, Suppl: 122S-123S.

Ng, V. L., Gartner, I., Weymouth, L. A., Goodman, C. D., Hopewell, P. C. & Hadley, W. K. (1989). The use of mucolysed induced sputum for the identification of pulmonary pathogens associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 113: 488-493.

Ng, V. L., Yajko, D. M. & Hadley, W. K. (1997). Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin.Microbiol.Rev.*, 10: 401-418.



Ng, V. L., Yajko, D. M., McPhaul, L. W., Gartner, I., Byford, B., Goodman, C. D., Nassos, P. S., Sanders, C. A., Howes, E. L., Leoung, G., *et al.* (1990). Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J.Clin.Microbiol.*, 28: 975-979.

Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Certad, G., Le, F. Y., Chartier, C., Verdier, R. I., Cailliez, J. C., Camus, D., Dei-Cas, E. & Banuls, A. L. (2006). *Cryptosporidium* population genetics: evidence of clonality in isolates from France and Haiti. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 53 Suppl 1: S33-S36.

Nielsen, M. H. & Settnes, O. P. (1991). Morphology of *Pneumocystis carinii* and activation of the plasmalemmal vesicular system in alveolar epithelial cells of the host. An ultrastructural study. *APMIS*, 99: 219-225.

Nimri, L. F., Moura, I. N., Huang, L., Del, R. C., Rimland, D., Duchin, J. S., Dotson, E. M. & Beard, C. B. (2002). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J.Clin.Microbiol.*, 40: 1146-1151.

Noller, H. F. (1984). Structure of ribosomal RNA. *Annu.Rev.Biochem.*, 53: 119-162.

Olsson, M., Elvin, K., Lidman, C., Lofdahl, S. & Linder, E. (1996a). A rapid and simple nested PCR assay for the detection of *Pneumocystis carinii* in sputum samples. *Scand.J.Infect.Dis.*, 28: 597-600.

Olsson, M., Elvin, K., Lofdahl, S. & Linder, E. (1993). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 221-226.

Olsson, M., Lidman, C., Latouche, S., Bjorkman, A., Roux, P., Linder, E. & Wahlgren, M. (1998). Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *J.Clin.Microbiol.*, 36: 1737-1740.

Olsson, M., Sukura, A., Lindberg, L. A. & Linder, E. (1996b). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scand.J.Infect.Dis.*, 28: 279-282.

Opravil, M., Hirschel, B., Lazzarin, A., Heald, A., Pechere, M., Ruttimann, S., Iten, A., von Overbeck, J., Oertle, D., Praz, G., *et al.* (1995). Once-weekly administration of dapsone/pyrimethamine vs. aerosolized pentamidine as combined prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin.Infect.Dis.*, 20: 531-541.

Opravil, M., Marincek, B., Fuchs, W. A., Weber, R., Speich, R., Battegay, M., Russi, E. W. & Luthy, R. (1994). Shortcomings of chest radiography in detecting *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*, 7: 39-45.

Oz, H. S. & Hughes, W. T. (2000). Search for *Pneumocystis carinii* DNA in upper and lower respiratory tract of humans. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 37: 161-164.

- Paine, R., III, Preston, A. M., Wilcoxon, S., Jin, H., Siu, B. B., Morris, S. B., Reed, J. A., Ross, G., Whitsett, J. A. & Beck, J. M. (2000). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J.Immunol.*, 164: 2602-2609.
- Paixão, M. T. (2008). Epidemiologia da infecção por VIH e da sida - impacto mundial. In: Manual sobre SIDA, 3ª edição. Francisco Antunes (Editor). Permanyer Portugal. (pp. 79-86).
- Paella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J. & Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N.Engl.J.Med.*, 338: 853-860.
- Palluault, F., Soulez, B., Slomianny, C., Dei-Cas, E., Cesbron, J. Y. & Camus, D. (1992). High osmotic pressure for *Pneumocystis carinii* London Resin White embedding enables fine immunocytochemistry studies: I. Golgi complex and cell-wall synthesis. *Parasitol.Res.*, 78: 482-488.
- Pastinen, T., Raitio, M., Lindroos, K., Tainola, P., Peltonen, L. & Syvanen, A. C. (2000). A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res.*, 10: 1031-1042.
- Pastores, S. M., Garay, S. M., Naidich, D. P. & Rom, W. N. (1996). Review: pneumothorax in patients with AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am.J.Med.Sci.*, 312: 229-234.
- Paulsrud, J. R. & Queener, S. F. (1994). Incorporation of fatty acids and amino acids by cultured *Pneumocystis carinii*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 633-638.
- Peglow, S. L., Smulian, A. G., Linke, M. J., Pogue, C. L., Nurre, S., Crisler, J., Phair, J., Gold, J. W., Armstrong, D. & Walzer, P. D. (1990). Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. *J.Infect.Dis.*, 161: 296-306.
- Pesanti, E. L. (1984). *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage. *Infect.Immun.*, 44: 7-11.
- Pesanti, E. L. & Cox, C. (1981). Metabolic and synthetic activities of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Infect.Immun.*, 34: 908-914.
- Peters, S. E., Wakefield, A. E., Sinclair, K., Millard, P. R. & Hopkin, J. M. (1992). A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J.Pathol.*, 166: 195-198.
- Peterson, J. C. & Cushion, M. T. (2005). *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr.Opin.Microbiol.*, 8: 393-398.
- Pifer, L. L., Hughes, W. T., Stagno, S. & Woods, D. (1978). *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics*, 61: 35-41.

Pinlaor, S., Mootsikapun, P., Pinlaor, P., Phunmanee, A., Pipitgool, V., Sithithaworn, P., Chumpia, W. & Sithithaworn, J. (2004). PCR diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum and bronchoalveolar lavage samples in immuno-compromised patients. *Parasitol.Res.*, 94: 213-218.

Pitchenik, A. E., Fischl, M. A., Dickinson, G. M., Becker, D. M., Fournier, A. M., O'Connell, M. T., Colton, R. M. & Spira, T. J. (1983). Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians: evidence of a new acquired immunodeficiency state. *Ann.Intern.Med.*, 98: 277-284.

Pixley, F. J., Wakefield, A. E., Banerji, S. & Hopkin, J. M. (1991). Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol.Microbiol.*, 5: 1347-1351.

Rabodonirina, M., Vanhems, P., Couray-Targe, S., Gillibert, R. P., Ganne, C., Nizard, N., Colin, C., Fabry, J., Touraine, J. L., van Melle, G., Nahimana, A., Francioli, P. & Hauser, P. M. (2004). Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis pneumonia* among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg.Infect.Dis.*, 10: 1766-1773.

Rabodonirina, M., Wilmotte, R., Dannaoui, E., Persat, F., Bayle, G. & Mojon, M. (1997). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by PCR amplification in various rat organs in experimental pneumocystosis. *J.Med.Microbiol.*, 46: 665-668.

Radhi, S., Alexander, T., Ukwu, M., Saleh, S. & Morris, A. (2008). Outcome of HIV-associated *Pneumocystis pneumonia* in hospitalized patients from 2000 through 2003. *BMC.Infect.Dis.*, 8: 118.

Raviglione, M. C. (1990). Extrapulmonary pneumocystosis: the first 50 cases. *Rev.Infect.Dis.*, 12: 1127-1138.

Redhead, S. A., Cushion, M. T., Frenkel, J. K. & Stringer, J. R. (2006). *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 53: 2-11.

Riebold, D., Fritzsche, C., Lademann, M., Bier, A. & Reisinger, E. C. (2006). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations at codon 171 but not at codons 55 or 57 detected in Germany. *Clin.Infect.Dis.*, 42: 582-583.

Rivero, L., de la Horra, C., Montes-Cano, M. A., Rodriguez-Herrera, A., Respaldiza, N., Friaza, V., Morilla, R., Gutierrez, S., Varela, J. M., Medrano, F. J. & Calderon, E. J. (2008). *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg.Infect.Dis.*, 14: 1116-1118.

Robberts, F. J., Chalkley, L. J., Weyer, K., Goussard, P. & Liebowitz, L. D. (2005). Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J.Clin.Microbiol.*, 43: 1443-1444.

Rohner, P., Jacomo, V., Studer, R., Schrenzel, J. & Graf, J. D. (2009). Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection*, 37: 261-265.

Roths, J. B. & Sidman, C. L. (1992). Both immunity and hyperresponsiveness to *Pneumocystis carinii* result from transfer of CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells into severe combined immunodeficiency mice. *J.Clin.Invest*, 90: 673-678.

Roux, P., Ha, M. C., Brucker, G. & Costagliola, D. (1998). *Pneumocystis* and pneumocystosis in Europe at the end of the 20th century. *FEMS Immunol.Med. Microbiol.*, 22: 87-91.

Ruffini, D. D. & Madhi, S. A. (2002). The high burden of *Pneumocystis carinii* pneumonia in African HIV-1-infected children hospitalized for severe pneumonia. *AIDS*, 16: 105-112.

Ruffolo, J. J. (1994). *Pneumocystis carinii* cell structure. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2<sup>a</sup> edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 25-43).

Ruffolo, J. J., Cushion, M. T. & Walzer, P. D. (1989). Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *J.Protozool.*, 36: 53S-54S.

Rys, P. N. & Persing, D. H. (1993). Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 2356-2360.

Safrin, S., Finkelstein, D. M., Feinberg, J., Frame, P., Simpson, G., Wu, A., Cheung, T., Soeiro, R., Hojczyk, P. & Black, J. R. (1996). Comparison of three regimens for treatment of mild to moderate *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. A double-blind, randomized, trial of oral trimethoprim-sulfamethoxazole, dapsone-trimethoprim, and clindamycin-primaquine. ACTG 108 Study Group. *Ann.Intern.Med.*, 124: 792-802.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.*, 4: 406-425.

Sanchez, C. A., Chabe, M., Aliouat, e. M., Durand-Joly, I., Gantois, N., Conseil, V., Lopez, C., Duriez, T., Dei-Cas, E. & Vargas, S. L. (2007). Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Med.Mycol.*, 45: 701-707.

Sanchez, J. J., Borsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernandez, A. & Morling, N. (2003). Multiplex PCR and minisequencing of SNPs-a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci.Int.*, 137: 74-84.

Sattler, F. R., Cowan, R., Nielsen, D. M. & Ruskin, J. (1988). Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with pentamidine for treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A prospective, noncrossover study. *Ann.Intern.Med.*, 109: 280-287.

Sattler, F. R., Frame, P., Davis, R., Nichols, L., Shelton, B., Akil, B., Baughman, R., Hughlett, C., Weiss, W., Boylen, C. T., *et al.* (1994). Trimetrexate with leucovorin versus trimethoprim-sulfamethoxazole for moderate to severe episodes of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS: a prospective, controlled multicenter investigation of the AIDS Clinical Trials Group Protocol 029/031. *J.Infect.Dis.*, 170: 165-172.

Sauer, S., Gelfand, D. H., Boussicault, F., Bauer, K., Reichert, F. & Gut, I. G. (2002). Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, 30: e22.

Saulsbury, F. T., Bernstein, M. T. & Winkelstein, J. A. (1979). *Pneumocystis carinii* pneumonia as the presenting infection in congenital hypogammaglobulinemia. *J.Pediatr.*, 95: 559-561.

Schmatz, D. M., Powles, M., McFadden, D. C., Pittarelli, L. A., Liberator, P. A. & Anderson, J. W. (1991). Treatment and prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia and further elucidation of the *P. carinii* life cycle with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitor L-671,329. *J.Protozool.*, 38: 151S-153S.

Schneider, M. M., Hoepelman, A. I., Eeftinck Schattenkerk, J. K., Nielsen, T. L., van der Graaf, Y., Frissen, J. P., van der Ende, I., Kolsters, A. F. & Borleffs, J. C. (1992). A controlled trial of aerosolized pentamidine or trimethoprim-sulfamethoxazole as primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection. The Dutch AIDS Treatment Group. *N.Engl.J.Med.*, 327: 1836-1841.

Schnell, J. R., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2004). Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*, 33: 119-140.

Schnipper, S., Small, C. B., Lehach, J., Kaufman, A., Grizzanti, J. N., Rothstein, M., Minkowitz, S. & Rosenstreich, D. L. (1993). *Pneumocystis carinii* pneumonia presenting as asthma: increased bronchial hyperresponsiveness in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Ann.Allergy*, 70: 141-146.

Sepkowitz, K. A. (1993). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without AIDS. *Clin.Infect.Dis.*, 17 Suppl 2: S416-S422.

Shah, J. S., Pieciak, W., Liu, J., Buharin, A. & Lane, D. J. (1996). Diversity of host species and strains of *Pneumocystis carinii* is based on rRNA sequences. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 3: 119-127.

Sham, P., Bader, J. S., Craig, I., O'Donovan, M. & Owen, M. (2002). DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nat.Rev.Genet.*, 3: 862-871.

Shaw, S. H., Carrasquillo, M. M., Kashuk, C., Puffenberger, E. G. & Chakravarti, A. (1998). Allele frequency distributions in pooled DNA samples: applications to mapping complex disease genes. *Genome Res.*, 8: 111-123.

Shelhamer, J. H., Ognibene, F. P., Macher, A. M., Tuazon, C., Steiss, R., Longo, D., Kovacs, J. A., Parker, M. M., Natanson, C., Lane, H. C., *et al.* (1984). Persistence of *Pneumocystis carinii* in lung tissue of acquired immunodeficiency syndrome patients treated for *Pneumocystis* pneumonia. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 130: 1161-1165.

Shen, L. X., Babilion, J. P. & Stanton, V. P., Jr. (1999). Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96: 7871-7876.

- Shuber, A. P., Grondin, V. J. & Klinger, K. W. (1995). A simplified procedure for developing multiplex PCRs. *Genome Res.*, 5: 488-493.
- Sidhu, G. S., Cassai, N. D. & Pei, Z. (2003). *Pneumocystis carinii*: an update. *Ultrastruct.Pathol.*, 27: 115-122.
- Sinclair, K., Wakefield, A. E., Banerji, S. & Hopkin, J. M. (1991). *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 45: 183-184.
- Sing, A., Roggenkamp, A., Autenrieth, I. B. & Heesemann, J. (1999). *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J.Clin.Microbiol.*, 37: 3409-3410.
- Singer, C., Armstrong, D., Rosen, P. P. & Schottenfeld, D. (1975). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a cluster of eleven cases. *Ann.Intern.Med.*, 82: 772-777.
- Siripattanapipong, S., Leelayoova, S., Mungthin, M., Worapong, J. & Tan-Ariya, P. (2008). Study of DHPS and DHFR genes of *Pneumocystis jirovecii* in Thai HIV-infected patients. *Med.Mycol.*, 46: 389-392.
- Skelly, M. J., Holzman, R. S. & Merali, S. (2008). S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clin.Infect.Dis.*, 46: 467-471.
- Sloand, E., Laughon, B., Armstrong, M., Bartlett, M. S., Blumenfeld, W., Cushion, M., Kalica, A., Kovacs, J. A., Martin, W., Pitt, E., *et al.* (1993). The challenge of *Pneumocystis carinii* culture. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 40: 188-195.
- Smith, D., Davies, S., Nelson, M., Youle, M., Gleeson, J. & Gazzard, B. (1990). *Pneumocystis carinii* pneumonia treated with eflornithine in AIDS patients resistant to conventional therapy. *AIDS*, 4: 1019-1021.
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M. & Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90: 4384-4388.
- Smulian, A. G., Sesterhenn, T., Tanaka, R. & Cushion, M. T. (2001). The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. *Genetics*, 157: 991-1002.
- Smulian, A. G., Sullivan, D. W., Linke, M. J., Halsey, N. A., Quinn, T. C., MacPhail, A. P., Hernandez-Avila, M. A., Hong, S. T. & Walzer, P. D. (1993). Geographic variation in the humoral response to *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.*, 167: 1243-1247.
- Soulez, B., Palluault, F., Cesbron, J. Y., Dei-Cas, E., Capron, A. & Camus, D. (1991). Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J.Protozool.*, 38: 123S-125S.
- Srivastava, I. K., Morrissey, J. M., Darrouzet, E., Daldal, F. & Vaidya, A. B. (1999). Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol.Microbiol.*, 33: 704-711.

- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A. G., Zheng, M., Brown, G. D., Gordon, S., Shellito, J. E. & Kolls, J. K. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J.Exp.Med.*, 198: 1677-1688.
- Stover, D. E., Greeno, R. A. & Gagliardi, A. J. (1989). The use of a simple exercise test for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 139: 1343-1346.
- Stringer, J. R. (2002). *Pneumocystis*. *Int.J.Med.Microbiol.*, 292: 391-404.
- Stringer, J. R. (1996). *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? *Clin.Microbiol.Rev.*, 9: 489-498.
- Stringer, J. R. (1994). Molecular genetics of *Pneumocystis carinii*. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 73-90).
- Stringer, J. R. (2007). Antigenic variation in *Pneumocystis*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 54: 8-13.
- Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F. & Wakefield, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg.Infect.Dis.*, 8: 891-896.
- Stringer, J. R. & Cushion, M. T. (1998). The genome of *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 22: 15-26.
- Stringer, J. R., Cushion, M. T. & Wakefield, A. E. (2001). New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, Suppl: 184S-189S.
- Stringer, J. R., Edman, J. C., Cushion, M. T., Richards, F. F. & Watanabe, J. (1992). The fungal nature of *Pneumocystis*. *J.Med.Vet.Mycol.*, 30 Suppl 1: 271-278.
- Stringer, J. R. & Keely, S. P. (2001). Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 69: 627-639.
- Stringer, J. R., Stringer, S. L., Zhang, J., Baughman, R., Smulian, A. G. & Cushion, M. T. (1993a). Molecular genetic distinction of *Pneumocystis carinii* from rats and humans. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 40: 733-741.
- Stringer, J. R., Wakefield, A. E., Cushion, M. T. & Dei-Cas, E. (1997). *Pneumocystis* taxonomy and nomenclature: an update. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 44: 5S-6S.
- Stringer, J. R. & Walzer, P. D. (1996). Molecular biology and epidemiology of *Pneumocystis carinii* infection in AIDS. *AIDS*, 10: 561-571.
- Stringer, S. L., Garbe, T., Sunkin, S. M. & Stringer, J. R. (1993b). Genes encoding antigenic surface glycoproteins in *Pneumocystis* from humans. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 40: 821-826.

- Stringer, S. L., Stringer, J. R., Blase, M. A., Walzer, P. D. & Cushion, M. T. (1989). *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp.Parasitol.*, 68: 450-461.
- Sul, D. & Kaneshiro, E. S. (1997). Ubiquinone synthesis by *Pneumocystis carinii*: incorporation of radiolabeled polyprenyl chain and benzoquinone ring precursors. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 44: 60S.
- Sun, T. & Zhang, Y. (2008). Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation. *Nucleic Acids Res.*, 36: 1654-1664.
- Sunkin, S. M., Linke, M. J., McCormack, F. X., Walzer, P. D. & Stringer, J. R. (1998). Identification of a putative precursor to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 66: 741-746.
- Sunkin, S. M. & Stringer, J. R. (1995). Transcription factor genes from rat *Pneumocystis carinii*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 42: 12-19.
- Sunkin, S. M. & Stringer, J. R. (1996). Translocation of surface antigen genes to a unique telomeric expression site in *Pneumocystis carinii*. *Mol.Microbiol.*, 19: 283-295.
- Swain, S. D., Wright, T. W., Degel, P. M., Gigliotti, F. & Harmsen, A. G. (2004). Neither neutrophils nor reactive oxygen species contribute to tissue damage during *Pneumocystis pneumonia* in mice. *Infect.Immun.*, 72: 5722-5732.
- Syvanen, A. C. (2001). Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat.Rev.Genet.*, 2: 930-942.
- Syvanen, A. C. (1999). From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum.Mutat.*, 13: 1-10.
- Takahashi, T., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Kitamura, Y. & Iwamoto, A. (2002a). Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in Japan. *J.Med.Microbiol.*, 51: 510-515.
- Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y. & Iwamoto, A. (2000). Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J.Clin.Microbiol.*, 38: 3161-3164.
- Takahashi, T., Kanda, T. & Iwamoto, A. (2002b). Genetic diversity of drug targets including dihydropteroate synthase, dihydrofolate reductase and cytochrome b, in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan. *Res.Commun.Mol.Pathol. Pharmacol.*, 112, 159-176.
- Tamburrini, E., Mencarini, P., De, L. A., Antinori, A., Visconti, E., Ammassari, A., Ortona, L., Ortona, E., Siracusano, A. & Vicari, G. (1993). Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 2788-2789.



Tamburrini, E., Mencarini, P., De, L. A., Visconti, E., Antinori, A., Ortona, E. & Siracusano, A. (1994). Detection of *Pneumocystis* DNA in serum and circulating cells is not a good diagnostic marker for Pneumocystosis in HIV patients. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 112S.

Tamburrini, E., Mencarini, P., Visconti, E., Zolfo, M., De, L. A., Siracusano, A., Ortona, E. & Wakefield, A. E. (1996). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 1586-1588.

Tang, X., Bartlett, M. S., Smith, J. W., Lu, J. J. & Lee, C. H. (1998). Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. *J.Clin.Microbiol.*, 36: 2491-2494.

Tasaka, S., Hasegawa, N., Kobayashi, S., Yamada, W., Nishimura, T., Takeuchi, T. & Ishizaka, A. (2007). Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest*, 131: 1173-1180.

Telzak, E. E. & Armstrong, D. (1994). Extrapulmonary infection and other unusual manifestations of *Pneumocystis carinii*. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 361-378).

Teramoto, S., Sawaki, D., Okada, S. & Ouchi, Y. (2000). Markedly increased plasma (1->3)-beta-D-glucan is a diagnostic and therapeutic indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a non-AIDS patient. *J.Med.Microbiol.*, 49: 393-394.

Terris, B., Marche, C. & Potet, F. (1996). [Extra-pulmonary pneumocystosis in the course of AIDS. Report of a case]. *Ann.Pathol.*, 16: 41-44.

Theus, S. A., Andrews, R. P., Steele, P. & Walzer, P. D. (1995). Adoptive transfer of lymphocytes sensitized to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* confers protection in the rat. *J.Clin.Invest*, 95: 2587-2593.

Theus, S. A., Linke, M. J., Andrews, R. P. & Walzer, P. D. (1993). Proliferative and cytokine responses to a major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 61: 4703-4709.

Theus, S. A., Sawhney, N., Smulian, A. G. & Walzer, P. D. (1998). Proliferative and cytokine responses of human T lymphocytes isolated from human immunodeficiency virus-infected patients to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.*, 177: 238-241.

Thomas, C. F., Jr. & Limper, A. H. (1998). *Pneumocystis* pneumonia: clinical presentation and diagnosis in patients with and without acquired immune deficiency syndrome. *Semin.Respir.Infect.*, 13: 289-295.

Thomas, C. F., Jr. & Limper, A. H. (2007). Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nat.Rev.Microbiol.*, 5: 298-308.

Tibayrenc, M. (1999). Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. *Annu.Rev.Genet.*, 33: 449-477.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Breniere, S. F., Darde, M. L. & Ayala, F. J. (1991). Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 88: 5129-5133.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, F. J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 87: 2414-2418.

Toma, E., Thorne, A., Singer, J., Raboud, J., Lemieux, C., Trottier, S., Bergeron, M. G., Tsoukas, C., Falutz, J., Lalonde, R., Gaudreau, C. & Therrien, R. (1998). Clindamycin with primaquine vs. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for mild and moderately severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS: a multicenter, double-blind, randomized trial (CTN 004). CTN-PCP Study Group. *Clin.Infect.Dis.*, 27: 524-530.

Torres, J., Goldman, M., Wheat, L. J., Tang, X., Bartlett, M. S., Smith, J. W., Allen, S. D. & Lee, C. H. (2000). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. *Clin.Infect.Dis.*, 30: 141-145.

Tsolaki, A. G., Beckers, P. & Wakefield, A. E. (1998). Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J.Clin.Microbiol.*, 36: 90-93.

Tsolaki, A. G., Miller, R. F., Underwood, A. P., Banerji, S. & Wakefield, A. E. (1996). Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J.Infect.Dis.*, 174: 141-156.

Turner, D., Schwarz, Y. & Yust, I. (2003). Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: new data, new issues. *Eur.Respir.J.*, 21: 204-208.

Valerio, A., Tronconi, E., Mazza, F., Fantoni, G., Atzori, C., Tartarone, F., Duca, P. & Cargnel, A. (2007). Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.*, 45: 521-528.

van Hal, S. J., Gilgado, F., Doyle, T., Barratt, J., Stark, D., Meyer, W. & Harkness, J. (2009). Clinical significance and phylogenetic relationship of novel Australian *Pneumocystis jirovecii* genotypes. *J.Clin.Microbiol.*, 47: 1818-1823.

Vargas, S. L., Hughes, W. T., Santolaya, M. E., Ulloa, A. V., Ponce, C. A., Cabrera, C. E., Cumsille, F. & Gigliotti, F. (2001). Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin.Infect.Dis.*, 32: 855-861.

Vargas, S. L., Hughes, W. T., Wakefield, A. E. & Oz, H. S. (1995). Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *J.Infect.Dis.*, 172: 506-510.

- Vargas, S. L., Ponce, C. A., Gigliotti, F., Ulloa, A. V., Prieto, S., Munoz, M. P. & Hughes, W. T. (2000). Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J.Clin.Microbiol.*, 38: 1536-1538.
- Vargas, S. L., Ponce, C. A., Hughes, W. T., Wakefield, A. E., Weitz, J. C., Donoso, S., Ulloa, A. V., Madrid, P., Gould, S., Latorre, J. J., Avila, R., Benveniste, S., Gallo, M., Belletti, J. & Lopez, R. (1999). Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin.Infect.Dis.*, 29: 1489-1493.
- Vartholitis, I., Aoun, M., Daneau, D. & Meunier, F. (1993). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with cancer. An increasing incidence. *Cancer*, 71: 481-485.
- Vavra, J. & Kucera, K. (1970). *Pneumocystis carinii delanoe*, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J.Protozool.*, 17: 463-483.
- Vidal, S., de la Horra, C., Martin, J., Montes-Cano, M. A., Rodriguez, E., Respaldiza, N., Rodriguez, F., Varela, J. M., Medrano, F. J. & Calderon, E. J. (2006). *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin.Microbiol.Infect.*, 12: 231-235.
- Visconti, E., Ortona, E., Mencarini, P., Margutti, P., Marinaci, S., Zolfo, M., Siracusano, A. & Tamburrini, E. (2001). Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 18: 547-551.
- Volpe, F., Ballantine, S. P. & Delves, C. J. (1993). The multifunctional folic acid synthesis fas gene of *Pneumocystis carinii* encodes dihydroneopterin aldolase, hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase and dihydropteroate synthase. *Eur.J.Biochem.*, 216: 449-458.
- Volpe, G., Sbaiz, L., Avanzini, C., Caramello, P. & Savoia, D. (2001). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* isolated from human immunodeficiency virus-positive patients in Turin, Italy. *J.Clin.Microbiol.*, 39: 2995-2998.
- Vreeland, W. N., Meagher, R. J. & Barron, A. E. (2002). Multiplexed, high-throughput genotyping by single-base extension and end-labeled free-solution electrophoresis. *Anal.Chem.*, 74: 4328-4333.
- Wachter, R. M., Luce, J. M., Turner, J., Volberding, P. & Hopewell, P. C. (1986). Intensive care of patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Outcome and changing patterns of utilization. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 134: 891-896.
- Wada, M. & Nakamura, Y. (1996). Unique telomeric expression site of major-surface-glycoprotein genes of *Pneumocystis carinii*. *DNA Res.*, 3: 55-64.
- Wakefield, A. E. (1996). DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 1754-1759.
- Wakefield, A. E. (2002). *Pneumocystis carinii*. *Br.Med.Bull.*, 61: 175-188.

Wakefield, A. E. (1998). Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 22: 59-65.

Wakefield, A. E., Fritscher, C. C., Malin, A. S., Gwanzura, L., Hughes, W. T. & Miller, R. F. (1994). Genetic diversity in human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from four geographical locations shown by analysis of mitochondrial rRNA gene sequences. *J.Clin.Microbiol.*, 32: 2959-2961.

Wakefield, A. E., Lindley, A. R., Ambrose, H. E., Denis, C. M. & Miller, R. F. (2003). Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J.Infect.Dis.*, 187: 901-908.

Wakefield, A. E., Miller, R. F., Guiver, L. A. & Hopkin, J. M. (1993). Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *Q.J.Med.*, 86: 401-406.

Wakefield, A. E., Peters, S. E., Banerji, S., Bridge, P. D., Hall, G. S., Hawksworth, D. L., Guiver, L. A., Allen, A. G. & Hopkin, J. M. (1992). *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Mol.Microbiol.*, 6: 1903-1911.

Wakefield, A. E., Pixley, F. J., Banerji, S., Sinclair, K., Miller, R. F., Moxon, E. R. & Hopkin, J. M. (1990b). Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 43: 69-76.

Wakefield, A. E., Pixley, F. J., Banerji, S., Sinclair, K., Miller, R. F., Moxon, E. R. & Hopkin, J. M. (1990a). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*, 336: 451-453.

Walker, A. N., Garner, R. E. & Horst, M. N. (1990). Immunocytochemical detection of chitin in *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 58: 412-415.

Walker, D. J., Wakefield, A. E., Dohn, M. N., Miller, R. F., Baughman, R. P., Hossler, P. A., Bartlett, M. S., Smith, J. W., Kazanjian, P. & Meshnick, S. R. (1998). Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J.Infect.Dis.*, 178: 1767-1775.

Walliker, D., Hunt, P. & Babiker, H. (2005). Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Trop.*, 94: 251-259.

Walzer P.D. (1994). Pathogenic mechanisms. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2ª edição. Walzer P.D. (Editor). New York: Marcel Dekker. (pp. 251-265).

Walzer, P. D., Evans, H. E., Copas, A. J., Edwards, S. G., Grant, A. D. & Miller, R. F. (2008). Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006. *Clin.Infect.Dis.*, 46: 625-633.

Wannamethee, S. G., Sirivichayakul, S., Phillips, A. N., Ubolyam, S., Ruxrungtham, K., Hanvanich, M. & Phanuphak, P. (1998). Clinical and immunological features of human immunodeficiency virus infection in patients from Bangkok, Thailand. *Int.J.Epidemiol.*, 27: 289-295.

- Watanabe, J., Hori, H., Tanabe, K. & Nakamura, Y. (1989). 5S ribosomal RNA sequence of *Pneumocystis carinii* and its phylogenetic association with "Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group". *J.Protozool.*, 36: 16S-18S.
- Weaver, T., Hall, C. L., Kachel, D. L., Ward, R. P., Williams, M. D., Perry, D. G., Wisniowski, P. & Martin, W. J. (1996). Assessment of in vivo attachment/phagocytosis by alveolar macrophages. *J.Immunol.Methods*, 193: 149-156.
- Weinberg, A. & Duarte, M. I. (1993). Respiratory complications in Brazilian patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, 35: 129-139.
- Weinberg, G. A. & Durant, P. J. (1994). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* derived from infected rats, mice, ferrets, and cell cultures. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 223-228.
- Weinberg, G. A., Dykstra, C. C., Durant, P. J. & Cushion, M. T. (1994). Chromosomal localization of 20 genes to five distinct pulsed field gel karyotypic forms of rat *Pneumocystis carinii*. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 41: 117S.
- Weverling, G. J., Mocroft, A., Ledergerber, B., Kirk, O., Gonzales-Lahoz, J., d'Arminio, M. A., Proenca, R., Phillips, A. N., Lundgren, J. D. & Reiss, P. (1999). Discontinuation of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. EuroSIDA Study Group. *Lancet*, 353: 1293-1298.
- Wissmann, G., varez-Martinez, M. J., Meshnick, S. R., Dihel, A. R. & Prolla, J. C. (2006). Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 53: 305-307.
- Worley, M. A., Ivey, M. H. & Graves, D. C. (1989). Characterization and cloning of *Pneumocystis carinii* nucleic acid. *J.Protozool.*, 36: 9S-11S.
- Worodria, W., Okot-Nwang, M., Yoo, S. D. & Aisu, T. (2003). Causes of lower respiratory infection in HIV-infected Ugandan adults who are sputum AFB smear-negative. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.*, 7: 117-123.
- Wright, T. W., Gigliotti, F., Finkelstein, J. N., McBride, J. T., An, C. L. & Harmsen, A. G. (1999). Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J.Clin.Invest*, 104: 1307-1317.
- Wyder, M. A., Rasch, E. M. & Kaneshiro, E. S. (1998). Quantitation of absolute *Pneumocystis carinii* nuclear DNA content. Trophic and cystic forms isolated from infected rat lungs are haploid organisms. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 45: 233-239.
- Yale, S. H. & Limper, A. H. (1996). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin.Proc.*, 71: 5-13.

Yoneda, K. & Walzer, P. D. (1983). Attachment of *Pneumocystis carinii* to type I alveolar cells studied by freeze-fracture electron microscopy. *Infect.Immun.*, 40: 812-815.

Yoshida, Y. (1989). Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J.Protozool.*, 36: 53-60.

Yoshida, Y., Matsumoto, Y., Yamada, M., Okabayashi, K., Yoshikawa, H. & Nakazawa, M. (1984). *Pneumocystis carinii*: electron microscopic investigation on the interaction of trophozoite and alveolar lining cell. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol. Hyg.[A]*, 256: 390-399.

Yoshikawa, H. & Yoshida, Y. (1989). Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*: a freeze-fracture study. *J.Protozool.*, 36: 51S-52S.

Ypma-Wong, M. F., Fonzi, W. A. & Sypherd, P. S. (1992). Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect.Immun.*, 60: 4140-4145.

Zaman, M. K. & White, D. A. (1988). Serum lactate dehydrogenase levels and *Pneumocystis carinii* pneumonia. Diagnostic and prognostic significance. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 137: 796-800.

Zaman, M. K., Wooten, O. J., Suprahmanya, B., Ankobiah, W., Finch, P. J. & Kamholz, S. L. (1988). Rapid noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. *Ann.Intern.Med.*, 109: 7-10.

Zar, H. J., Varez-Martinez, M. J., Harrison, A. & Meshnick, S. R. (2004). Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin.Infect.Dis.*, 39: 1047-1051.

Zellweger, C., Opravil, M., Bernasconi, E., Cavassini, M., Bucher, H. C., Schiffer, V., Wagens, T., Flepp, M., Rickenbach, M. & Furrer, H. (2004). Long-term safety of discontinuation of secondary prophylaxis against *Pneumocystis* pneumonia: prospective multicentre study. *AIDS*, 18: 2047-2053.

Zhang, J. & Stringer, J. R. (1993). Cloning and characterization of an alpha-tubulin-encoding gene from rat-derived *Pneumocystis carinii*. *Gene*, 123: 137-141.

Zhao, H., Giner, J. L. & Kaneshiro, E. S. (2003). Definitive structural identities of *Pneumocystis jirovecii* sterols. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 50 Suppl: 680.

## **ANEXOS**





## **Anexo I**



**Lavado brocoalveolar (LBA)**

As amostras foram obtidas por via broncofibroscópica, sob anestesia local. Cada LBA foi obtido, posteriormente ao encravamento do fibroscópio no lobo médio do doente, instilando 150 ml de soro fisiológico pré-aquecido a 37° C, dividido por três seringas de 50 ml, tendo sido aspirado suavemente. As amostras, obtidas por este processo, foram recolhidas em recipientes estéreis e enviadas para o laboratório. Todos os procedimentos foram efectuados por técnicos especializados.

**Expectoração induzida (EI)**

Com o objectivo de garantir uma boa higiene oral e uma hidratação adequada, previamente à recolha das EI, todos os doentes respeitaram um período de jejum para alimentos sólidos de 12 horas. A todos os doentes administrou-se uma solução salina hipertónica a 1,8 %, durante 15 minutos, através de um nebulizador ultrassónico. As amostras, obtidas por este processo, foram recolhidas em recipientes estéreis e enviadas para o laboratório. Todos os procedimentos foram efectuados por técnicos especializados.



## **Anexo II**



### **Tratamento de lâminas com poli-L-lisina**

Mergulham-se as lâminas em álcool ácido a 1%, as quais são secas com papel absorvente. De seguida, colocam-se as lâminas numa solução de poli-L-lisina a 1:10, durante 5 minutos, deixando-se secar à temperatura ambiente.

### **Tampão de lise (tiocianato de guanidina 7 M; Tris-HCl 50 mM pH 6,4; EDTA 25 mM pH 8,0; Triton X-100 1,5% v/v) 200 ml**

(Adaptado de Boom *et al.* 1990)

Pesam-se 120 g de tiocianato de guanidina (SIGMA), aos quais se adicionam 100 ml de Tris-HCl (Tris(hidroximetileno)aminometano-ácido clorídrico) (0,1M, pH 6,4) 22 ml de EDTA (ácido etilenodiaminatetracético) (0,2M, pH 8) e 2,6 ml de Triton X-100 (Serva). Perfaz-se o volume final com água destilada. A dissolução do tiocianato de guanidina é facilitada por aquecimento a 60-65°C, com agitação. Devido ao tiocianato de guanidina sofrer decomposição térmica a temperaturas superiores a 115°C, o tampão não pode ser autoclavado, sendo a sua esterilização efectuada por filtração com filtro Whatman nº1 ou equivalente. A solução é estável à temperatura ambiente, no escuro, durante pelo menos 3 semanas.

### **Suspensão aquosa de sílica em pó (1% pH 2,0; SIGMA) (30 ml)**

(Adaptado de Boom *et al.* 1990)

Colocam-se 30 g de sílica (SIGMA) numa proveta de 250 ml. Perfaz-se o volume com água destilada, agita-se vigorosamente e deixa-se sedimentar durante 24 horas à temperatura ambiente. Desprezam-se cerca de 215 ml de sobrenadante e volta-se a adicionar água destilada até perfazer o volume de 250 ml. Agita-se fortemente e deixa-se sedimentar durante 5 horas à temperatura ambiente. Desprezam-se 220 ml de sobrenadante e adicionam-se 300 µl de ácido clorídrico concentrado (Merck) aos 30 ml de suspensão final, de forma a acidificar até pH 2. Dividir alíquotas de cerca de 5 ml por vários frascos. Após autoclavagem, a solução é estável durante pelo menos 6 meses, quando armazenada no escuro, a 4°C.

### **Tampão de lavagem (tiocianato de guanidina 7 M; Tris-HCl 50 mM pH 6,4) (200 ml)**

(Adaptado de Boom *et al.* 1990)

A 120 g de tiocianato de guanidina (SIGMA), juntam-se 100 ml de Tris-HCl (0,1M, pH 6,4). O volume final é preenchido com água destilada. A dissolução do tiocianato de guanidina é facilitada por aquecimento a 60-65°C, com agitação. Devido ao tiocianato de guanidina sofrer decomposição térmica a temperaturas superiores a 115°C, o tampão não pode ser autoclavado, sendo a esterilização feita por filtração com filtro Whatman nº1 ou equivalente. A solução é estável à temperatura ambiente, no escuro, durante pelo menos 3 semanas.

### **Preparação de um gel de acrilamida a 10%**

Os vidros de sequenciação são cuidadosamente lavados com *alconox* 1% e água destilada. Após estarem secos, são colocados entre os vidros separadores com 0,5 mm de espessura, procedendo-se à selagem com fita adesiva. O gel é preparado por adição de 8,75 ml de acrilamida líquida (SIGMA), 17,5g de ureia (Merck), 3,5 ml de tampão TBE 10x, perfazendo-se o volume final (35 ml) com água destilada. A solução é agitada até apresentar um aspecto homogêneo e translúcido, sendo filtrada com filtros *Millipore* 0,22 µm e degaseificada durante 10 minutos, recorrendo-se a uma bomba de vácuo. De seguida são adicionados à solução 175 µl de persulfato de amónio (SIGMA) e 19,68 µl de TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina) (SIGMA), que funcionam como agentes polimerizantes da acrilamida. A mistura é cuidadosamente adicionada entre os vidros de sequenciação, e, no final, é colocado um pente de 24 poços. Após polimerização, a parte exterior dos vidros é lavada com água destilada e o gel é colocado no aparelho DNA Gene Scanner 373 (Applied Biosystems).



### **Anexo III**



**UNIDADE DE PROTOZOÁRIOS OPORTUNISTAS / VIH  
E OUTRAS PROTOZOoses – IHMT**

**PNEUMONIA POR PNEUMOCYSTIS JIROVECHII (PPc):**

**Identificação de múltiplos marcadores polimórficos em *Pneumocystis jirovecii*: relação com a evolução clínica**

Número:

Data \_\_/\_\_/\_\_

Nome (iniciais):

Sexo: M ☐ F ☐

Data de Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

Raça: \_\_\_\_\_

Comportamento de Risco:

VIH+: Sim ☐ Não ☐

Nº Processo ou NID:

Clínico:

Hospital :

**Diagnóstico clínico:**

**Episódios anteriores de PPC:**

**Data:**

**CD4+ :**

**PaO2 :**

**Carga viral :**

**Rx Tórax :**

**Profilaxia anti-PPC :**

Fármaco :

Data de início : \_\_/\_\_/\_\_

**Terapêutica anti-PPC:**

Fármaco :

Data de início : \_\_/\_\_/\_\_

**Melhorou com o tratamento:**

Sim:

Não:

**Diagnóstico de saída:**

## **“IDENTIFICAÇÃO DE MÚLTIPLOS MARCADORES POLIMÓRFICOS EM PNEUMOCYSTIS JIROVECHII: RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA”**

Instituições locais: Instituto de Higiene e Medicina / Tropical Hospital de Santa Maria

### **INFORMAÇÕES A DAR AO DOENTE PARA PARTICIPAR NO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO**

Coordenador do projecto - Olga Matos MD, PhD

Investigadores responsáveis no HSM - Francisco Antunes, MD, PhD

- Paula Monteiro, MD

#### **INTRODUÇÃO:**

Antes de dar o seu consentimento para participar neste estudo, deverá ser informado(a) do propósito, benefícios, riscos, desconforto e precauções desta investigação. Se não pretender participar neste estudo, deverá ser informado dos exames laboratoriais, alternativos, existentes.

A sua participação neste estudo é voluntária, sem qualquer benefício proveniente do estudo. Em qualquer momento, pode desistir de participar no estudo, sem que seja prejudicado no seu seguimento médico.

Toda a informação que nos fornecer será confidencial.

#### **QUEM É QUE NÃO DEVE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?**

Pessoas com menos de 18 anos e pessoas.

### QUANTO TEMPO DURA A SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

A sua participação resume-se a uma visita.

### PORQUE É QUE ESTA INVESTIGAÇÃO ESTÁ A DECORRER?

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc) é a infeção oportunista mais frequente em doentes com infeção VIH/SIDA tendo sido, também, já descritos casos de infeção em seronegativos para VIH, com graus moderados de imunodeficiência. Doentes com lesões a nível pulmonar causadas por patologias específicas, demonstram, supostamente, um risco maior de serem colonizados por este microrganismo.

Até ao momento, as tentativas de associar genótipos específicos de *Pneumocystis* com a informação clínica (por exemplo, severidade da doença) têm sido infrutíferas. Tendo por base estes dados, coloca-se a hipótese de a virulência, resistência e severidade da PPc estar dependente da associação de polimorfismos múltiplos, que ocorrem em diversas regiões do genoma do microrganismo.

### QUEM É RESPONSÁVEL PELO ESTUDO?

Trata-se de um estudo a nível nacional, que envolve várias instituições, e, que será conduzido no Instituto de Higiene e Medicina Tropical pela Prof. Dra. Olga Matos.

### QUANTOS DOENTES PARTICIPARÃO NO ESTUDO?

Cerca de 150 a 200 doentes, em Portugal.

### O QUE É QUE LHE É PEDIDO?

Será recolhido de cada doente uma amostra de lavado broncoalveolar (LBA) ou de expectoração induzida. A amostra será devidamente identificada e guardada para estudo posterior. A colheita só será feita no contexto da recolha de amostras para outros exames necessários no âmbito dos cuidados médicos habituais a prestar aos doentes.

QUAIS OS BENEFÍCIOS QUE TERÁ POR PARTICIPAR NO ESTUDO?

Não terá benefícios directos, por participar no estudo. Indirectamente, ajudará a esclarecer várias dúvidas relativas à associação de polimorfismos múltiplos em *Pneumocystis*, que poderão estar relacionados com a virulência, resistência e gravidade da pneumocistose.

SE NÃO QUISE PARTICIPAR OU SE QUISE DESISTIR A MEIO DO ESTUDO SERÁ DE ALGUM MODO, PREJUDICADO?

Se não quiser participar ou se quiser desistir a meio do estudo nunca será prejudicado, nem no seu atendimento, nem no seu tratamento.

TERÁ ALGUMA DESPESA EXTRA POR PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Não, não terá nenhuns custos acrescidos por participar no estudo que lhe é proposto.

A SUA PARTICIPAÇÃO SERÁ PAGA?

A sua participação no estudo não será paga.

SE TIVER QUAQUER DÚVIDAS, E SE AS QUISE ESCLARECER, CONTACTE O PROF. DR. FRANCISCO ANTUNES (HSM 217805274), A DRA. PAULA MONTEIRO (HSM 217805292) OU A PROF. DRA. OLGA MATOS (213652638).

## CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_

autorizo que o material colhido (secreções pulmonares e sangue) seja utilizado para um estudo da infecção por *Pneumocystis jirovecii*.

Todos os meus dados pessoais se manterão dentro da mais estrita confidencialidade.

Ass.) \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_.





## **Anexo IV**



### Teste combinatório d1

Numa dada população, o cálculo da extensão da sobre-representação de determinados genótipos pode ser quantificada pelo cálculo da probabilidade (**P**) de observar tantos ou mais indivíduos, com um determinado genótipo, do que aquilo que realmente é esperado, quando se está perante uma população com distribuição panmítica:

$$P = \sum_{i=m}^n \frac{n! \cdot x^i \cdot (1-x)^{n-i}}{i! \cdot (n-i)!}$$

Onde **x** é a probabilidade da ocorrência do MLG, considerando a hipótese nula, com recombinação aleatória de material genético entre organismos da mesma população, calculada pela multiplicação das frequências observadas de cada um dos genótipos simples, que compõem o MLG; **n** corresponde ao número de indivíduos na amostra; **m** corresponde ao número de indivíduos da amostra em que o MLG foi detectado.

